

Aus dem Institut für Immunologie

Direktor : Prof. Dr. med. Hans-Jürgen Thiesen



**Die Korrelation von Promotor- und Transmembran Polymorphismus im
FCGR2b-Gen mit dem klinischen Bild der rheumatoiden Arthritis**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin
der Universitätsmedizin Rostock

vorgelegt von
Stefanie Meister
geboren am 19.01.1985 in Gießen

aus Bamberg

Rostock, August 2015

Dekan: Prof. Dr. med. univ. E.C. Reisinger, MBA

Dekan: Prof. Dr. med. univ. Emil Christian Reisinger, MBA

1. Gutachter:	Prof. Dr. Brigitte Müller-Hilke,	Universitätsmedizin Rostock
2. Gutachter:	PD Dr. Michel Linnebacher,	Universitätsmedizin Rostock
3. Gutachter:	Prof. Dr. Uwe Völker,	Universitätsmedizin Greifswald

Datum der Abgabe: 20.08.2015

Datum der Verteidigung: 12.07.2016

[1] Alle verwendeten Maskulina bei Personenbezeichnungen schließen auch weibliche Personen mit ein.

I. Inhaltsverzeichnis

I. Inhaltsverzeichnis.....	I
II. Abbildungsverzeichnis.....	III
III. Abkürzungsverzeichnis	IV
IV. Tabellenverzeichnis.....	VI
1 Einleitung.....	1
1.1 Problemstellung.....	1
1.2 Aufbau der Arbeit	2
1.3 Ziel der Arbeit	3
2 Rheumatoide Arthritis und Fc Rezeptor Typ IIb	5
2.1 Rheumatoide Arthritis.....	5
2.1.1 Epidemiologie	5
2.1.2 Pathophysiologie	5
2.1.3 Klinik und Diagnostik	11
2.1.4 Therapie.....	12
2.2 Lage und Physiologie des Fc γ RIIb	13
2.2.1 Der regulierende Fc γ RIIb	13
2.3 Genetische Polymorphismen des <i>FCGR2b</i>	17
2.3.1 Promotor Polymorphismus	18
2.3.2 Transmembran Polymorphismus.....	18
2.4 Hypothese	20
3 Material und Methoden.....	21
3.1 DNA-Isolierung aus Blutproben.....	21
3.2 Amplifikation des <i>FCGR2b</i> Rezeptorfragments	21
3.3 Sequenzierung nach Sanger.....	23
3.3.1 Aufreinigung des PCR-Produktes.....	24
3.3.2 Sequenzierungsreaktion	25
3.3.3 Ethanolpräzipitation	26
3.3.4 Sequenzierung mittels kapillarer Gelelektrophorese	26
3.3.5 Auswertung der Sequenzreaktion.....	27
3.4 Externe Daten	28
3.5 Statistische Analyse	28

4	Ergebnisse	29
4.1	Charakteristika der Patientengruppen.....	29
4.2	Trend zur Basistherapie der RA bei Patienten mit einem seltenen Allel	31
4.3	Kaum nachweisbarer Serumspiegel von Interleukin 6 bei Trägern eines seltenen Allels	33
4.4	Ähnliche Konzentrationen des C-reaktiven Proteins in den Untersuchungsgruppen	35
4.5	Erstdiagnose erfolgt bei Trägern eines seltenen Allels zu einem späteren Zeitpunkt.....	36
4.6	Keine Unterschiede der Krankheitsaktivität.....	37
4.7	Höhe der ACPA-Titer variiert nicht zwischen den Kohorten.....	38
4.8	Differenzierte Lymphozytenaktivierung bei RA-Patienten in Abhängigkeit der Allelausprägung im Promotor oder TM-Exon	40
4.8.1	Geringere CTLA-4 Expression auf T-Lymphozyten bei Trägern eines seltenen Allels	40
4.8.2	Veränderte Expression der kostimulatorischen Oberflächenantigene CD80/CD86 auf B-Lymphozyten bei Trägern des seltenen Allels.....	42
5	Diskussion	46
6	Fazit und Ausblick	60
V.	Anhang	61
VI.	Literaturverzeichnis	66
VII.	Danksagung	75
VIII.	Thesen	76
IX.	Eidesstattliche Erklärung.....	77

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Schema zur Pathophysiologie der RA.....	6
Abbildung 2:	Schema zum dualen Signalweg mittels Kostimulation.....	7
Abbildung 3:	Schema zur Signalkaskade der aktivierenden Fc-Rezeptoren (FcR).....	9
Abbildung 4:	Schema der Koaktivierung von BCR und Fc γ RIIb mittels Immunkomplex.....	14
Abbildung 5:	Koaktivierung aktivierender und hemmender Fc γ R mittels Immunkomplex.....	15
Abbildung 6:	Lage der Primer zur Amplifikation von Promotor und Transmembran-Exon.....	22
Abbildung 7:	Schematische Anordnung der Primer zur Sequenzierung.....	25
Abbildung 8:	Visuelle Darstellung der Sequenzierungsreaktion im Basenabschnitt des TM-Exons an der Stelle der Allelvariante (695 T>C; rs1050501) mit dem Primer „Transmembran forward“.....	27
Abbildung 9:	Schematische Darstellung der Gruppeneinteilung.....	30
Abbildung 10:	Im Trend erhalten Träger eines seltenen Allels auf einem der beiden Loci eher die Basistherapie mit DMARDs und Cortisol.....	32
Abbildung 11:	Träger eines seltenen Allels zeigen einen geringeren IL6 Serumspiegel.....	33
Abbildung 12:	Bei Vorliegen eines seltenen Allels in einem Locus fällt die antiinflammatorische Antwort gemessen am IL10 Serumspiegel deutlich geringer aus.....	34
Abbildung 13:	Kein Unterschied der Entzündungsaktivität gemessen am CRP-Spiegel.....	35
Abbildung 14:	Träger eines seltenen Allels weisen auf einen Trend zu späterer Erstdiagnose der RA hin.....	36
Abbildung 15:	Kein schwererer Verlauf bei Trägern eines seltenen Allels gemessen am DAS28.....	37
Abbildung 16:	Kein Unterschied der einzelnen ACPA-Titer zwischen Trägern ausschließlich „häufiger Allele“ und eines „seltenen Allels“.....	39
Abbildung 17:	Geringere Expressionsstärke von CTLA-4 bei Trägern eines seltenen Allels.....	40
Abbildung 18:	CTLA-4 wird bei Trägern eines seltenen Allels im TM-Exon signifikant niedriger exprimiert als in den Vergleichsgruppen.....	41
Abbildung 19:	Die Expression von CD86 auf naiven B-Zellen ist bei Trägern eines seltenen Allels im TM-Exon am niedrigsten.....	42
Abbildung 20:	Die Expression von CD86 auf B-Gedächtniszellen ist bei seltenem Allel im TM-Exon am niedrigsten.....	43
Abbildung 21:	Träger eines Promotorpolymorphismus exprimieren deutlich mehr CD80 auf B-Gedächtniszellen.....	44

III. Abkürzungsverzeichnis

ACPA.....	<i>Antikörper gegen citrullinierte Peptidantigene</i>
AL Buffer.	<i>Lösung zur Zellyse</i>
APC.	<i>Antigen präsentierende Zelle</i>
AW1 Buffer.	<i>Waschpuffer 1</i>
AW2 Buffer.	<i>Waschpuffer 2</i>
BCR.	<i>B-Zell Rezeptor</i>
bp.	<i>Basenpaare</i>
C.	<i>Cytosin</i>
Ca ²⁺	<i>zweiwertiges Calcium</i>
CCP.	<i>cyclisches citrulliniertes Peptid</i>
CIA.	<i>Kollagen induzierte Arthritis</i>
CTx.	<i>carboxy-terminale collagen crosslinks</i>
DAS28.	<i>Disease activity Score 28</i>
DC.	<i>dendritische Zellen</i>
ddNTPs.	<i>dideoxy-Nukleotid-Triphosphat</i>
DMARDs.	<i>Disease modifying antirheumatic Drugs</i>
dNTPs.	<i>desoxy-Nukleotid-Triphosphat</i>
DTCS.	<i>Dye Terminator Cycle Sequencing</i>
ELISA.	<i>enzym-linked immunosorbent assay</i>
Fc.	<i>fragment crystallisable</i>
FcγRIIb.	<i>humanes Protein des Fc gamma Rezeptors 2b</i>
fcγRIIb.	<i>murines Protein des Fc gamma Rezeptors 2b,</i>
FCGR2b.	<i>humanes Gen des Fc gamma Rezeptors 2b</i>
FcR.	<i>Fragment crystallisable Receptor</i>
G.	<i>Guanin</i>
HPLC.	<i>Hochdruckflüssigkeitschromatographie</i>
Ig.	<i>Immunglobulin</i>
IL10.	<i>Interleukin 10</i>
ITAM.	<i>Immunoreceptor tyrosin-based activation Motif</i>
ITIM.	<i>Immunoreceptor tyrosin-based inhibitory Motif</i>
MCV.	<i>mutiertes cyclisches Vimentin</i>
MFI.	<i>mediane fluoreszenz Intensität</i>
MHC II.	<i>Haupt- Histokompatibilitäts-Komplex II</i>
MTX.	<i>Methotrexat</i>

NSAR.	<i>Nicht steroidale Antirheumatika</i>
OD.	<i>optische Dichte</i>
PBS.	<i>Phosphat gepufferte Salzlösung</i>
PCR.	<i>Polymerase-Kettenreaktion</i>
RA.	<i>rheumatoride Arthritis, rheumatoride Arthritis</i>
RF.	<i>Rheumafaktor</i>
SLE.	<i>Systemischer Lupus erythematoses</i>
SNP.	<i>Einzelnukleotidpoymorphismus</i>
TCR.	<i>T-Zell Rezeptor</i>
TM.	<i>Transmembran</i>
TNF α	<i>Tumornekrosefaktor alpha</i>
u.a.	<i>unter anderem</i>

IV. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Chemikalien zur Amplifikation des 2,3kb Fragments	22
Tabelle 2:	Primer für PCR Fragment	23
Tabelle 3:	PCR-Protokoll	23
Tabelle 4:	Primer zur Sequenzreaktion	25
Tabelle 5:	Gruppeneinteilung für häufiges Allel und seltenes Allel	29

1 Einleitung

1.1 Problemstellung

Eine der wichtigsten Eigenschaften des adaptiven Immunsystems besteht darin, diverse Krankheitserreger zu erkennen und zu eliminieren. Die pathogenen Organismen müssen von körpereigenen differenziert werden. Denn nur so bleibt eine Schädigung des eigenen Organismus aus. Um dies zu gewährleisten, muss das adaptive Immunsystem Toleranz gegenüber körpereigenen, nicht-pathogenen Organismen entwickeln. Diese Immuntoleranz wird einerseits durch die Negativselektion der autoreaktiven Lymphozyten in Knochenmark und Thymus geprägt (zentrale Toleranz) und andererseits durch die Minderung der erworbenen Immunantwort außerhalb der lymphatischen Organe (periphere Toleranz) (Schütt, 2011). Ein wichtiger Rezeptor für die periphere Toleranzentwicklung der B-Lymphozyten ist ein Membranrezeptor für die Fc-Domäne der Immunglobuline G vom Strukturtyp IIb (Fc γ RIIb). Liegt eine Fehlfunktion dieses Rezeptors vor, begünstigt dieser die Ausbildung von autoreaktiven Zellen, so dass das Vorliegen von Polymorphismen im *FCGR2b* Gen häufiger mit Autoimmunerkrankungen assoziiert wurde (Catalan et al., 2010; Chu et al., 2014; Mauri und Jury, 2010; Radstake et al., 2006).

Polymorphismen im Gen des *FCGR2b* sind seit mehreren Jahren Bestandteil der immunologischen Forschung im Kontext von Autoimmunerkrankungen. Das Paradebeispiel für Untersuchungen der *FCGR2b* Polymorphismen ist in der Vergangenheit der systemische Lupus erythematoses (SLE) gewesen. In diesen Studien konnte nachgewiesen werden, dass Träger eines seltenen (mutierten) Allels im *FCGR2b* Gen statistisch signifikant häufiger an einem SLE erkranken als Träger häufiger (Wildtyp) Allele (Blank et al., 2005; Clatworthy et al., 2007; Floto et al., 2005; Kono et al., 2005). Dies legt die Vermutung nahe, dass ebenfalls andere Autoimmunerkrankungen mit Polymorphismen im *FCGR2b* Gen assoziiert sein können.

Für das *FCGR2b* Gen sind mehrere Mutationen bekannt. Die am besten beschriebenen Polymorphismen für dieses Gen sind der Transmembran-Polymorphismus (rs1050501) und der Promotorpolymorphismus (rs3219018). Beide Polymorphismen führen zu einer Fehlfunktion des Fc γ RIIb, die mit einer unkontrollierten Antikörperproduktion assoziiert ist (Nimmerjahn und Ravetch, 2008).

Im Fokus dieser Arbeit steht deshalb die Frage, ob diese zwei Polymorphismen des *FCGR2b* mit Autoimmunerkrankungen wie der rheumatoide Arthritis (RA), welche ebenfalls durch eine gesteigerte Auto-Antikörperproduktion charakterisiert ist, assoziiert sind. Die Assoziation der *FCGR2b* Polymorphismen mit der RA wurde in der Vergangenheit nur isoliert für das Vorliegen eines seltenen Allels im TM-Exon betrachtet. Hier wurde eine vermehrte Gelenkdestruktion beobachtet. Der Zusammenhang von beiden genannten Polymorphismen (TM-Exon und Promotor) des *FCGR2b* mit der RA stellt somit bis heute keinen isolierten Forschungsschwerpunkt dar (Chen et al., 2008; Radstake et al., 2006). Um die wissenschaftliche Lücke zu schließen, bildet diese Thematik die herausfordernde Problemstellung und den Kern der vorliegenden Arbeit, womit sie als Erste den Zusammenhang zwischen der RA und dem Auftreten von zwei Polymorphismen im *FCGR2b* Gen untersucht.

1.2 Aufbau der Arbeit

Neben der Einleitung und dem Fazit gliedert sich diese Arbeit in vier weitere Kapitel. Zu Beginn wird das Krankheitsbild der rheumatoiden Arthritis mit den wesentlichen Aspekten zur Epidemiologie, Pathophysiologie sowie zur Diagnostik, Klinik und Therapie vorgestellt. Anschließend wird die Lokalisation des *FCGR2b* im Genom beschrieben. Im Verlauf erfolgt die Erläuterung der physiologischen Funktion des FcγRIIb sowie der bisher bekannten Auswirkungen beider Polymorphismen.

Das Kapitel 3 „Material und Methoden“ beschreibt die einzelnen Untersuchungsschritte von der Blutentnahme über die DNA-Isolierung, die Polymerase-Ketten-Reaktion bis hin zur Sequenzierung nach der Kettenabbruchreaktion. Zudem werden die statistischen Methoden zur Auswertung der Ergebnisse vorgestellt.

Im Zentrum von Kapitel 4 stehen die Ergebnisse der Untersuchung. Es beschreibt zunächst die Einteilung der Patientengruppen nach Ausprägung der Polymorphismen im Transmembran (TM) - Exon und Promotor. Zur Charakterisierung der Auswirkungen beider Allelvarianten wurden bei allen Patienten das Alter bei Erstdiagnose, die medikamentöse Therapie der RA und die laborchemischen Entzündungsparameter herangezogen. Zudem erfolgte die Bestimmung des Krankheitsaktivitätsindex „DAS28“ und der Autoantikörper-Titer. Neben klinischen und laborchemischen Parametern waren auch zelluläre Marker des Immunsystems Gegenstand der Untersuchung. Die Analyse der Funktionen des adaptiven Immunsystems konnte anhand der

Erfassung von spezifischen Oberflächenmolekülen auf T- und B-Lymphozyten durchgeführt werden. In Abhängigkeit der vorliegenden Polymorphismen im TM-Exon oder Promotor ist die Ausprägung der Oberflächenmoleküle miteinander verglichen worden.

Die Diskussion der Frage, ob das Vorliegen eines seltenen Allels mit einem gravierenden Verlauf der RA korreliert, bildet das Kernelement in Kapitel 5. Die Erörterung der bereits beschriebenen negativen Assoziationen von TM-Polymorphismus und Promotorpolymorphismus mit dem SLE steht am Beginn dieses Kapitels. In einem zweiten Schritt werden die klinischen Aspekte (Erkrankungsalter, Krankheitsaktivitätsindex „DAS28“) sowie laborchemischen Parameter (IL6, CRP, ACPA-Nachweis) und die medikamentöse Therapie herangezogen, um den Zusammenhang zwischen den Polymorphismen und der RA zu erörtern. Die Einbeziehung der zellulären Merkmale des Immunsystems als weitere Komponente rundet die wissenschaftliche Auseinandersetzung mit der Fragestellung ab.

In einem Fazit werden die Ergebnisse der einzelnen Abschnitte synthetisiert.

1.3 Ziel der Arbeit

Mit der RA wird eine multifaktoriell bedingte, systemische Autoimmunerkrankung betrachtet, zu deren Pathogenese auch nach mehreren Jahren intensiver Forschung viele Fragen ungeklärt sind. Bekannt ist, dass auf zellulärer Ebene sowohl T-Lymphozyten als auch B-Lymphozyten an der Pathogenese der RA beteiligt sind (Cope et al., 2007; Dörner et al., 2009). Ergebnisse aus der Zwillingsforschung deuten darauf hin, dass sowohl genetische Prädispositionen als auch Umweltfaktoren mit der Krankheitsentstehung der RA korrelieren (Clarke und Vyse, 2009; Jawaheer et al., 2001). Genomweite Assoziationsstudien haben diverse RA assoziierte Allele identifiziert. Obgleich für viele Allelvarianten noch keine funktionsverändernden Wirkungen belegt sind, weist die Datenlage dennoch darauf hin, dass eine komplexe Kombination aus Umweltfaktoren und Allelvarianten das variable klinische Bild der RA prägt. Welche Allelvarianten einen direkten Einfluss auf die Mechanismen der Pathogenese der RA haben, ist derzeit unklar (Kurkó et al., 2013).

Im Zusammenhang mit Autoimmunerkrankungen ist das *FCGR2b*-Gen in das Zentrum der Forschung gerückt, wobei erste Ergebnisse darauf hindeuten, dass das transkribierte Protein, FcγRIIb, an der peripheren Toleranzentwicklung des Immun-

systems beteiligt ist. Liegt eine Allelvariante im DNA-Abschnitt des Rezeptors vor, wird das Gleichgewicht der peripheren Immuntoleranz geschädigt (Nimmerjahn und Ravetch, 2006, 2008, 2010). Im Fokus der vorliegenden Arbeit stehen deshalb die im TM-Exon (rs1050501) und im Promotor (rs3219018) identifizierten Polymorphismen des *FCGR2b*-Gens (U.S. National Library of Medicine, 2014a, 2014b). Ziel dieser Arbeit ist zu beobachten, ob eine Autoimmunerkrankung wie die RA mit dem Auftreten der genannten Polymorphismen assoziiert ist. Zusätzlich wird untersucht, ob Träger einer Allelvariante eine Korrelation mit einem aggressiveren klinischen Verlauf der RA aufweisen. Auch die Analyse der Frage, ob sich die Kohorte der Träger eines seltenen Allels durch bestimmte Merkmale charakterisieren lässt, stellt ein Ziel der vorliegenden Arbeit dar.

2 Rheumatoide Arthritis und Fc Rezeptor Typ IIb

2.1 Rheumatoide Arthritis

2.1.1 Epidemiologie

Die RA ist eine Autoimmunerkrankung mit chronisch entzündlichem Verlauf. Die Ursachen und Risikofaktoren der autoimmunen Reaktion sowie die pathophysiologischen Folgereaktionen sind weiterhin Bestandteil der aktuellen Forschung und bis heute nicht vollständig geklärt. In jüngster Zeit haben wissenschaftliche Ergebnisse gezeigt, dass Entzündungsreaktionen durch Rauchen oder Erreger der Parodontitis (*Porphyromonas gingivalis*) die Autoimmunreaktion initiieren und somit epidemiologische Risikofaktoren für die Krankheitsentstehung der RA darstellen (Klareskog et al., 2010; Scher et al., 2014; Sestak et al., 1999). In Deutschland kommt die RA mit einer Prävalenz von 0,5% vor. Jährlich werden in etwa 20 pro 100000 Männer und circa 20-70 pro 100000 Frauen neu diagnostiziert. Schon die Verteilung der Inzidenz zeigt, dass Frauen zwei- bis dreimal häufiger betroffen sind als Männer. Das Erkrankungsalter in Europa liegt zwischen 50 und 70 Jahren (Zink et al., 2001).

2.1.2 Pathophysiologie

Die genetische Prädisposition und die Summe der eintreffenden Umweltreize lösen eine Immunreaktion aus (vergleiche Abbildung 1). Infolge der lokalen Entzündungsreaktion kann es zu Kreuzreaktionen der infektiös-inflammatorischen Antigene mit körpereigenen Epitopen kommen. Die fremden Epitope weisen eine Ähnlichkeit zu körpereigenen Epitopen auf. Aufgrund der molekularen Mimikry werden Immunreaktionen sowohl gegen das fremde Antigen als auch gegen körpereigene Antigene eingeleitet. Die molekulare Mimikry ist auf diese Weise mit verantwortlich für die Entstehung der autoimmunen Erkrankung. Im Falle der RA werden u.a. Antikörper gegen citrullinierte Peptidantigene (ACPA) gebildet (Albani und Carson, 1996; Wilson et al., 2000). Die Citrullinierung von Peptiden erfolgt posttranslational durch eine enzymatische Reaktion. Sie findet physiologisch bei der Keratinisierung der Haut und bei Reaktionen des Immunsystems statt. Weiter spielt die Citrullinierungsreaktion eine Rolle

bei der Erhaltung der Plastizität des Gehirns (György et al., 2006). Bei RA-Patienten sind die Enzyme zur Citrullinierungsreaktion im Synovialgewebe lokalisiert (Foulquier et al., 2007). Weiterhin ist für die RA eine erhöhte Anzahl von aktivierten T-Lymphozyten sowie eine Anhäufung von B-Lymphozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen (DC) in Synovialflüssigkeit und -gewebe charakteristisch (Feldmann et al., 1996). Gelenkspezifische Antigene locken die Effektorzellen an, mit der Folge einer erhöhten Zellzahl in Synovialflüssigkeit und -gewebe (Albani und Carson, 1996). Die angelockten Zellen erkennen die citrullinierten Antigene im Gelenk als fremde Antigene und leiten sowohl unspezifische als auch spezifische Immunreaktionen gegen diese Antigene ein. Die aktivierten Zellen des angeborenen Immunsystems wandern in die Lymphknoten und präsentieren den T-Lymphozyten Antigene. Die T-Lymphozyten werden über den dualen Signalweg, Antigenpräsentation und Kostimulation, aktiviert. Die Antigenpräsentation erfolgt über den Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex Typ II (MHC II) auf den antigenpräsentierenden Zellen (APC). Das MHC gebundene Antigen bindet an den T-Zell-Rezeptor (TCR) auf den T-Lymphozyten.

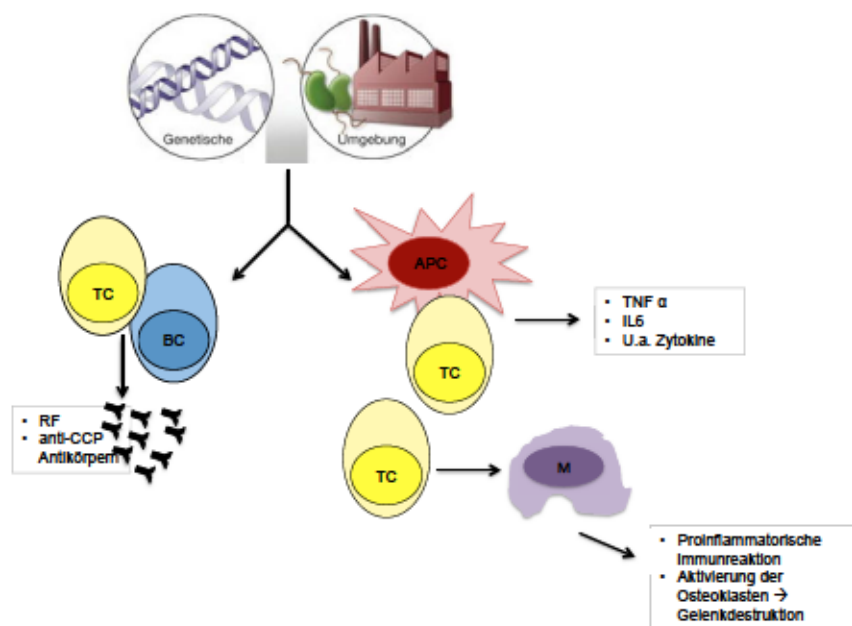


Abbildung 1: Schema zur Pathophysiologie der RA. Genetische Faktoren und Einflüsse aus der Umgebung stellen Reize zur Aktivierung des Immunsystems dar. Antigenpräsentierende Zellen (APC) binden an T-Lymphozyten (TC) und fördern deren Differenzierung sowie die proinflammatorische Zytokinausschüttung von TNF α und IL6. Die T-Lymphozyten (TC) interagieren ebenfalls mit B-Lymphozyten (BC) und fördern deren Ausdifferenzierung zu antikörperproduzierenden Plasmazellen. So werden Rheumafaktoren (RF) gebildet und anti-CCP Antikörper, die zur diagnostischen Sicherung genutzt werden. Des Weiteren wirken T-Lymphozyten (TC) über Zytokinsekretion auf Makrophagen (M). Über diesen Weg wird die Entzündungsreaktion ebenso unterhalten. Gleichzeitig kommt es zur Aktivierung der Osteoklasten mit der Folge der Gelenkdestruktion (Fauci et al., 2008). Abbildung erstellt in Anlehnung an Fauci et. al (Fauci et al., 2008).

Der zweite Signalweg, die Kostimulation, wird eingeleitet durch die Bindung von CD28 der T-Lymphozyten an die Oberflächenmoleküle CD80/CD86 auf APC (Greene et al., 1996). Die Interaktion von CD28 mit CD80/86 leitet eine aktivierende Signalkaskade ein (vergleiche Abbildung 2A.). Dieser kostimulatorische Signalweg über CD28 induziert eine Proliferation der T-Lymphozyten, fördert die Migration ins Gelenk sowie die weitere Sezernierung proinflammatorischer Botenstoffe (Cope et al., 2007; Sakaguchi et al., 2008). Durch die Botenstoffe werden diverse Immunzellen ange- lockt. Makrophagen und Fibroblasten sezernieren im Gelenk proinflammatorische Botenstoffe, wie Tumornekrosefaktor α (TNF α) und IL6 (Scott und Kingsley, 2006). Die Folge ist eine Gelenkentzündung. Die Veränderung des Endothels unterhält die Immunreaktion und begünstigt die Einwanderung weiterer Effektorzellen. Die Kombi- nation aus proinflammatorischen Botenstoffen, Wachstumsfaktoren und Immunzellen sorgt für die Pannusbildung im Gelenk durch Synoviozyten (Srirangan und Choy, 2010). Eine weitere Folge ist die Aktivierung von Osteoklasten, wodurch vermehrt Knochen resorbiert wird (Scott und Kingsley, 2006). Die beschriebene Pannusbil- dung und die verstärkte Resorption des Knochens tragen wesentlich zur klinisch cha- rakteristischen Gelenkdestruktion der RA bei. Bei Aktivierung der T-Lymphozyten wird vermehrt das cytotoxische Lymphozyten Antigen 4 (CTLA-4) an der Oberfläche der T-Lymphozyten exprimiert. Dieses Molekül stammt aus intrazellulären Speichern und steht in Konkurrenz mit CD28 um die Bindung an die kostimulatorischen Molekü- le CD80/86 (Greene et al., 1996; Manzotti et al., 2002).

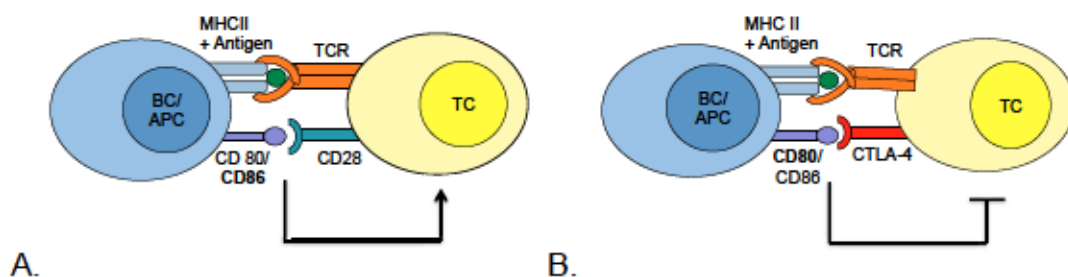


Abbildung 2: Schema zum dualen Signalweg mittels Kostimulation. A. Stellt den aktivierenden dualen Signalweg zwischen B-Lymphozyten (BC) oder Antigenpräsentierenden Zellen (APC) und T-Lymphozyten (TC) dar. Der duale Signalweg wird über die Bindung des Haupt-Histokompatibilitätskomplex (MHCII) gebundenen Antigens mit dem T-Zell-Rezeptor (TCR) sowie dem kostimulatorischen Molekül CD80/86 mit CD28 eingeleitet und führt zur physiologischen Aktivierung der T-Lymphozyten. B. Schema der dualen Signalkaskade ausgelöst durch die Interaktion von B-Lymphozyten (BC) oder Antigenpräsentierenden Zellen (APC) mit T-Lymphozyten (TC). Die Bindung des an den Haupt-Histokompatibilitätskomplex (MHCII) gebundenen Antigens mit dem T-Zell-Rezeptor (TCR) sowie des kostimulatorischen Moleküls CD80/86 mit dem cytotoxischen Lymphozyten Antigen 4 (CTLA-4) führt zur physiologischen Hemmung der T-Lymphozyten. Die bevorzugten Bindungspartner von CD28 oder CTLA-4 sind fett markiert.

CTLA-4 übt eine regulierende Funktion auf die Antwort der T-Lymphozyten aus. Die Regulation erfolgt auf unterschiedlichen Wegen. Zum einen wird eine hemmende Signalkaskade über die indoleamine-2,3-dioxygenase eingeleitet (Koorella et al., 2014; Munn et al., 2004). In Folge der hemmenden Signalkaskade werden die T-Lymphozyten in den Status der Anergie versetzt (Vandenborre et al., 1999). Zum anderen besitzt CTLA-4 gegenüber CD80/86 eine stärkere Affinität als CD28, so dass die beiden Moleküle um die Bindung konkurrieren. Hierzu haben experimentelle Untersuchungen gezeigt, dass der bevorzugte Partner für CTLA-4 das Oberflächenmolekül CD80 darstellt. Eine Interaktion dieser beiden Moleküle erlaubt eine effektive Suppression der Immunantwort durch regulatorische T-Lymphozyten. Tritt hingegen CD86 an die Bindungsstelle zu CTLA-4, wird die suppressive Funktion der regulatorischen T-Lymphozyten unterbunden (Zheng et al., 2004). Als weiteren hemmenden Effekt ruft CTLA-4 eine verminderte Expression von CD80/86 hervor (Qureshi et al., 2011). In Summe bedeutet dies, dass eine verstärkte Ausprägung von CTLA-4 beziehungsweise eine erhöhte Anzahl von regulatorischen T-Lymphozyten für eine verminderte proinflammatorische Immunreaktion sorgt. Gleichzeitig wird dadurch die Anhäufung autoreaktiver T-Lymphozyten verhindert und so zum Erhalt der Homöostase von T-Lymphozyten beigetragen (Flores-Borja et al., 2008; Sakaguchi et al., 2008). Eine Dysfunktion oder eine reduzierte Expression von CTLA-4 spiegelt sich in einer verminderten Funktion von regulatorischen T-Lymphozyten wider und kann so zur Genese von Autoimmunerkrankungen wie der RA beitragen (Cope, 2008; Flores-Borja et al., 2008; Jain et al., 2010).

Neben den T-Lymphozyten sind am Prozess der autoimmunen Arthritis auch B-Lymphozyten beteiligt (O'Neill et al., 2005). Sie können sowohl als B-Lymphozyten als auch als APC mit T-Lymphozyten interagieren. Die antigenspezifische Interaktion wird durch kostimulatorische Moleküle unterhalten. Sie fördert einerseits die Differenzierung der B-Lymphozyten zu antikörperproduzierenden Plasmazellen, andererseits können sie in ihrer Funktion als APC die aktivierende T-Zellantwort restimulieren (Dörner und Burmester, 2003). So kommt es zur charakteristischen Produktion der Autoantikörper der RA sowie zu der Aktivierung autoreaktiver T-Lymphozyten (Emery et al., 2014). B-Lymphozyten exprimieren ebenfalls CD80/86 an ihrer Oberfläche, so dass sie T-Lymphozyten über den dualen Signalweg modulieren können. Gemäß der Literaturangaben divergiert der Effekt von CD80 und CD86 (Odobasic et al., 2008). Die Expression von CD86 auf B-Lymphozyten variiert in Abhängigkeit des

Aktivierungsgrades der Zellen (O'Neill et al., 2007). CD86 wird als weniger geeigneter Bindungspartner für CTLA-4 beschrieben. Das Molekül scheint aufgrund der Struktur deutlich leichter an CD28 zu binden (Collins et al., 2002). Wird CD86 von CTLA-4 gebunden, werden eher modulierende Signalkaskaden eingeleitet, die u.a. die suppressive Funktion regulatorischer T-Lymphozyten limitieren (Zheng et al., 2004). O'Neill und Kollegen bestätigen dies mit Untersuchungen am Mausmodell. Sie haben gezeigt, dass die Expression von CD86 auf B-Lymphozyten für die Aktivierung von autoreaktiven T-Lymphozyten benötigt wird und so wesentlich die Entstehung der RA beeinflusst (O'Neill et al., 2007). Ähnliches hat die Untersuchung von Chu und Kollegen gezeigt. In den Ergebnissen von Chu et al. weisen B-Lymphozyten bei RA-Patienten eine gesteigerte Expressionsdichte von CD86 auf. Dies beweist den gesteigerten Aktivierungsgrad der B-Lymphozyten bei RA-Patienten (Chu et al., 2014). CD80 hingegen bindet aufgrund der biophysikalischen Eigenschaften besser an CTLA-4 (Collins et al., 2002). In der Folge werden regulatorische T-Lymphozyten in dem Maße beeinflusst, dass sie ihrer suppressiven Funktion nachkommen können und die Ausbildung autoreaktiver Zellen verhindern (Manzotti et al., 2002; Zheng et al., 2004).

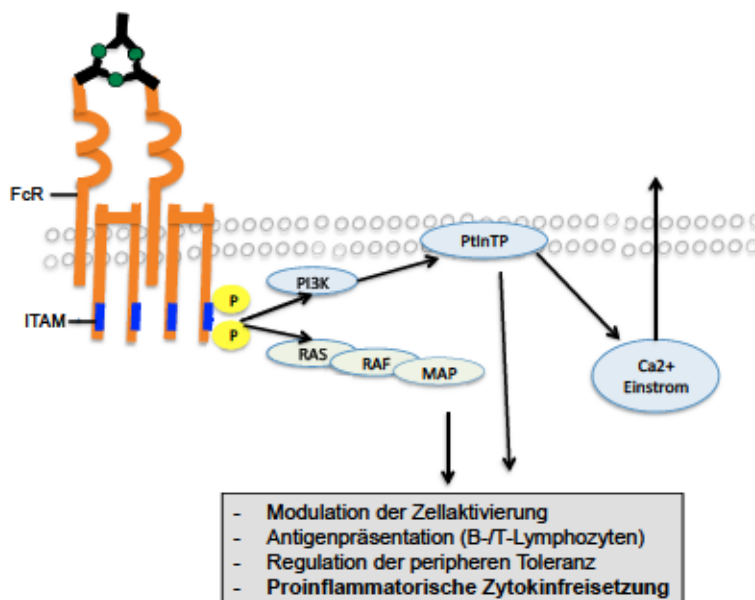


Abbildung 3: Schema zur Signalkaskade der aktivierenden Fc-Rezeptoren (FcR). Die Aktivierung der FcR erfolgt durch Immunkomplexe. Dies führt zur Phosphorylierung des „Immunoreceptor tyrosine-based activation Motifs (ITAM)“. Die Phosphorylierung aktiviert mittels Phospho-Inositid-3-Kinase-Signalweg (PI3K) den Phospho-Inositol-3,4,5 (Tri)-Phosphat Signalweg, der für einen vermehrten Einstrom von Calcium (Ca^{2+}) in das endoplasmatische Retikulum sorgt. Der zweite Signalweg initiiert durch die Phosphorylierung des ITAMs, aktiviert den Signalweg über die RAS-RAF-MAP-Kinasen. Beide Signalwege sorgen für eine Modulation der Zellaktivierung, fördern die Antigenpräsentation, regulieren die periphere Toleranzentwicklung und sorgen für eine vermehrte proinflammatorische Zytokinsekretion (Nimmerjahn und Ravetch, 2008).

Aktivierte B-Lymphozyten produzieren Antikörper in geringem Anteil eigenständig oder differenzieren zu den antikörperproduzierenden Plasmazellen. Die Antikörper besitzen die Eigenschaft Immunkomplexe zu bilden. Diese Immunkomplexe binden an Fc-Rezeptoren, welche die Immunantwort modulieren. Die Fc-Rezeptoren sind somit ein bedeutendes Bindeglied zwischen Autoantikörpern und Immunreaktion. Am Circulus vitiosus der Autoimmunreaktion sind die Fc-Rezeptoren wesentlich beteiligt (Nimmerjahn und Ravetch, 2008). Die Modulation der Immunantwort erfolgt durch die gegensätzliche Wirkung aktivierender und hemmender Fc-Rezeptoren. Die aktivierenden Fc-Rezeptoren sind als dimeres Protein in die Zellmembran eingebaut und wirken über ein intrazellulär gelegenes Immunoreceptor tyrosin-based activation Motif (ITAM) (vergleiche Abbildung 3). Dem gegenüber steht die hemmende Signalkaskade über den für diese Arbeit relevanten inhibierenden Fc Rezeptor γ vom Typ IIb (Fc γ RIIb). Dieser wird in Kapitel 2.2.1 näher erläutert. Die Balance zwischen aktivierenden und inhibierenden Signalwegen schützt vor überschießenden Immunreaktionen. Ein Ungleichgewicht zwischen aktivierenden und hemmenden Signalkaskaden kann beispielsweise im Rahmen von Autoimmunerkrankungen zu einer vermehrten Antikörperproduktion führen (Nimmerjahn und Ravetch, 2010). Bei der RA kommt es zur Bildung unterschiedlicher Autoantikörper. Die klinisch bedeutsamsten sind der Rheumafaktor (RF) sowie die Antikörper gegen citrullinierte Peptidantigene (ACPA). Der Nachweis der ACPAs ist mittlerweile ein etablierter diagnostischer sowie prognostischer Parameter in Klinik und Forschung (Egerer et al., 2009; Engelmann und Müller-Hilke, 2009).

Zusammenfassend lässt sich für die Pathophysiologie der RA festhalten, dass ein endogener Stimulus wie genetische Prädisposition oder exogener Stimulus wie Infektionserreger oder Rauchen eine Immunreaktion hervorruft. In der Folge kommt es zur Entzündungsreaktion. T- und B-Lymphozyten werden aktiviert und unterhalten die Entzündungsreaktion durch Sezernierung von Botenstoffen und Autoantikörpern. Durch molekulare Mimikry wird die Immunantwort nicht mehr gegen fremde sondern gegen körpereigene Antigene gerichtet. Dies ist in Abbildung 1 bereits schematisch dargestellt worden.

2.1.3 Klinik und Diagnostik

Klinisch ist das Krankheitsbild gekennzeichnet durch Schmerzen, Steifigkeit, symmetrische chronische Gelenkentzündung sowie Gelenkzerstörung und Rheumaknoten. Die vom Immunsystem initiierte Entzündungsreaktion stellt sich klinisch mit calor, dolor, rubor und tumor dar bis hin zum Funktionsverlust. Den Alltag der betroffenen Patienten beeinträchtigen neben den Schmerzen vor allem die Bewegungseinschränkungen. Die Autoimmunreaktion richtet sich nicht nur gegen die Gelenke, sondern kann auch andere Organsysteme betreffen. Klinisch manifestiert sich dies meist durch allgemeine Abgeschlagenheit bzw. grippeähnliche Symptome (Aletaha et al., 2010; Wells et al., 2009).

Die Diagnostik der Erkrankung erfolgt anhand internationaler klinischer Kriterien nach der „American Rheumatology Association“ und der „European League Against Rheumatism“. Dafür werden vier Kategorien anhand eines Punktesystems beurteilt. Erreichen die Patienten in Summe 6/10 Punkten oder mehr, so liegt eine RA vor. Die vier Kategorien bilden sich aus der Anzahl der geschwollenen Gelenke, den serologischen Blutuntersuchungen auf RF und ACPAs, der Bestimmung der Akut-Phase-Proteine und der Dauer der Symptome (Aletaha et al., 2010).

Die Labordiagnostik setzt sich zusammen aus der Bestimmung von Entzündungsparametern (Blutsenkungsgeschwindigkeit, C reaktives Protein, IL6) und Autoantikörpern (Rheumafaktor, ACPA). Die Bestimmung der ACPAs erfolgt aufgrund der diagnostischen Überlegenheit. Der Nachweis der ACPAs ist oft schon Jahre vor Ausbruch der RA möglich. Des Weiteren spricht der Nachweis für einen aggressiveren Verlauf der Erkrankung (Engelmann und Müller-Hilke, 2009). Um das Maß der Gelenkdestruktion zu bestimmen, werden röntgenologische Aufnahmen bewertet (Radstake et al., 2006). Als sensitiver Marker für die Beurteilung der momentanen Knochenresorption dienen die carboxy-terminalen collagen crosslinks (CTx) (Rosen et al., 2000).

Die Ausprägung der klinischen Aktivität der RA lässt sich anhand des „Disease Activity Scores 28“ (DAS28) quantifizieren. Der Score beinhaltet die Anzahl geschwollener, steifer und schmerzhafter Gelenke, die Bestimmung der Entzündungsparameter (CRP/BSG) sowie der Akute-Phase-Proteine. Weiterhin fließt der vom Patienten subjektiv empfundene Gesundheitszustand (visuelle Analogskala 0 (keine Einschränkungen) bis 100 (stärkste Einschränkungen)) in die Berechnung des DAS28 ein

(Welsing und Riel, 2004). Der Score erlaubt den Verlauf der Erkrankung zu dokumentieren und liefert eine Möglichkeit die Effektivität einer Therapie abzuleiten (Fransen et al., 2004; Wells et al., 2009). Der Referenzbereich des DAS28 liegt für eine fehlende Krankheitsaktivität bei 0,0 – 2,6 Punkten. Werden Werte des DAS28 zwischen 2,7 und 3,1 Punkten ermittelt, spricht man von einer geringen Krankheitsaktivität. Erreichen Patienten einen DAS28 zwischen 3,1 – 5,2 Punkten, so steht dies für eine mittlere Krankheitsaktivität. Werden mehr als 5,2 Punkte ermittelt, liegt eine hohe Krankheitsaktivität vor (Deutsche Gesellschaft für Rheumatologie, 2012; Fransen et al., 2004; Kavanaugh et al., 2012).

2.1.4 Therapie

Sobald die Diagnose RA gestellt ist, muss die Therapie schnellstmöglich eingeleitet werden. Die Patienten benötigen sowohl eine pharmakologische Therapie als auch Unterstützung durch physikalische und physiotherapeutische Maßnahmen sowie eine adäquate Hilfsmittelversorgung. Ziel der pharmakologischen Therapie ist die Verzögerung der Krankheitsprogression (Wollenhaupt et al., 2009). Die Patienten erhalten zur symptomatischen Behandlung bei Bedarf nicht-steroidale Antirheumatika (NSAR). Die Einleitung einer kortikosteroidhaltigen Therapie erfolgt bei gesicherter Diagnose.

In dieser Arbeit liegt der Schwerpunkt auf Medikamenten, die in das pathophysiologische Geschehen eingreifen. Um die Krankheitsprogression möglichst rasch zu verlangsamen, werden Disease modifying antirheumatic Drugs (DMARDs) eingesetzt. Hier stehen kleine Moleküle (im weiteren Verlauf als DMARDs bezeichnet) und Biologika zur Verfügung. Zu den DMARDs der Basistherapie zählen im Wesentlichen Methotrexat (MTX), Leflunomid und Sulfasalazin. Diese Präparate hemmen die Proliferation von Immunzellen und mildern dadurch den Krankheitsverlauf (Brune und Manger, 2010). MTX wird entsprechend der aktuellen Leitlinien standardmäßig als Mittel der ersten Wahl verordnet. Zur Überbrückung des verzögerten Wirkungseintritts von MTX wird die gleichzeitige Anwendung von Glukokortikoiden empfohlen. Kommt es unter dieser Standard-Basistherapie nach 3 Monaten zu keiner Verbesserung der Symptome, sollte eine klassische DMARD-Kombinationstherapie, beispielsweise MTX + Leflunomid, eingesetzt werden. Sofern nach weiteren 3 Monaten keine Kontrolle der Krankheitsaktivität erreicht wird, empfehlen die Leitlinien die

Kombination von MTX mit molekulargenetisch oder zellbiologisch hergestellten Antikörpern, so genannten Biologika (Deutsche Gesellschaft für Rheumatologie, 2012). Diese Medikamente unterbinden gezielt Schritte in der Entzündungskaskade der Autoimmunreaktion. Die wichtigsten Präparate sind Hemmer des inflammatorischen Zytokins TNF α . Infliximab, ein monoklonaler Fusionsantikörper aus Maus und Mensch, fängt gelöstes TNF α ab. Adalimumab und Etanercept sind weitere Präparate, die TNF α binden und so seine biologische Aktivität hemmen. Diese Hemmung sorgt für eine effektive Unterbrechung der Entzündungskaskade. Kommt es unter der Therapie mit TNF α -Blockern zu Unverträglichkeiten oder fehlender Kontrolle der Krankheitsaktivität, besteht die Möglichkeit auf andere Biologika mit unterschiedlichen Wirkmechanismen zurückzugreifen.

Tocilizumab blockiert den IL6-Rezeptor und verhindert so die Ausschüttung von Akut-Phase Proteinen sowie die Aktivierung von Osteoklasten. Die Wirkung von Tocilizumab unterbindet die Entzündungsreaktion und verhindert den verstärkten Knochenabbau (Brune und Manger, 2010; Smolen und Steiner, 2003). Die erfolgversprechende Indikation besteht vor allem für Patienten, die therapierefraktär für andere Biologika sind (Deutsche Gesellschaft für Rheumatologie, 2012; Wollenhaupt et al., 2009). Eine weitere therapeutische Methode ist die Modulation der B-Lymphozyten. Dies kann mit Hilfe des CD20 Antikörpers Rituximab erfolgen (Emery et al., 2014). Die B-Zellantwort lässt sich ebenfalls über den Fc γ RIIb modulieren, so dass dieser Rezeptor einen geeigneten Angriffspunkt zur medikamentösen Therapie darstellt. Chu et al. haben einen Antikörper getestet, der spezifisch an den Fc γ RIIb bindet und effektiv die B-Zell-Aktivierung in allen Reifestadien hemmt (Chu et al., 2014). Ob dieser sich in der Therapie der RA etabliert, bleibt abzuwarten.

2.2 Lage und Physiologie des Fc γ RIIb

2.2.1 Der regulierende Fc γ RIIb

Wie in Kapitel 2.1.2 beschrieben, sind Fc-Rezeptoren Membranrezeptoren für verschiedene Isotypen der Immunglobuline. Die FcR binden die Fc-Domäne der Antikörper und stellen somit das Bindeglied zwischen Antikörper und Immunreaktion dar. Das Gen für den *FCGR2b* ist auf Chromosom 1q32 lokalisiert und erstreckt sich über eine Länge von 15507 Basenpaaren. Das resultierende Protein, der Fc γ RIIb, wird in

seiner Expressionsstärke durch die Bindung von Transkriptionsfaktoren an den Promotor reguliert (Su et al., 2004a). Der Fc γ RIIb wird aus einem membranständigen monomeren Protein gebildet. Dieses durchzieht die Lipid-Doppelschicht und ragt bis ins Zytosol hinein. Die Funktionsfähigkeit des Rezeptors ist abhängig von seiner Integration in die Plasmamembran. Die Integration des Fc γ RIIb wird durch den Anteil und die Lokalisation des Cholesterins in der Lipid-Doppelschicht bestimmt (Nimmerjahn und Ravetch, 2006). Der Fc γ RIIb trägt auf dem zytosolischen Teil ein „immunoreceptor tyrosin-based inhibitory Motif“ (ITIM), über welches hemmende Signalkaskaden eingeleitet werden können (Bolland et al., 1998) (vergleiche Abbildung 4). Der Fc γ RIIb ist der einzige inhibitorische Rezeptor unter den FcR. Er wird auf Effektorzellen wie Makrophagen, neutrophilen Granulozyten, natürlichen Killerzellen, DC und Mastzellen gemeinsam mit aktivierenden FcR exprimiert.

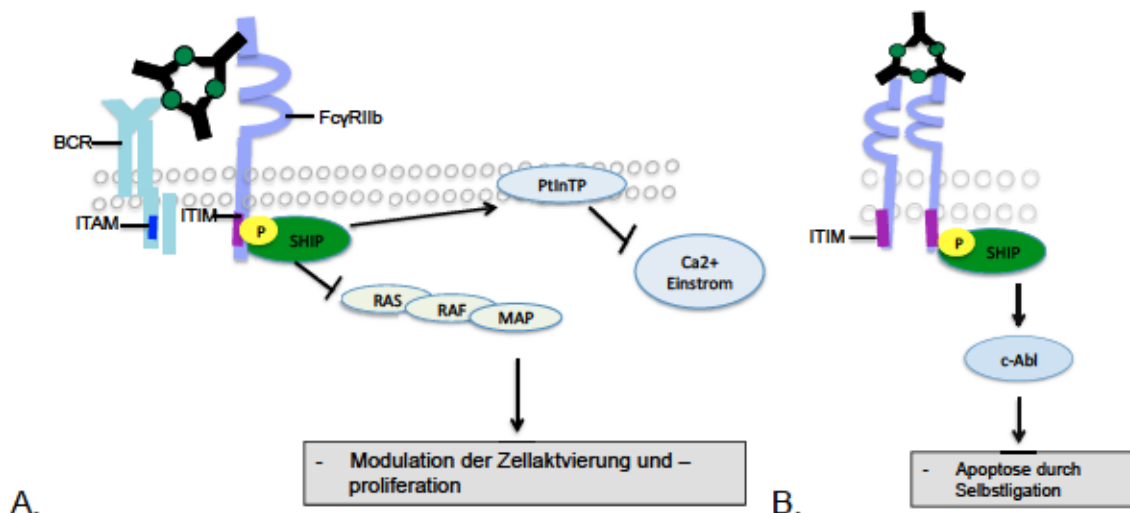


Abbildung 4: Schema der Koaktivierung von BCR und Fc γ RIIb mittels Immunkomplex. A. Signalkaskade des hemmenden Fc γ Rezeptors IIb (Fc γ RIIb) bei Quervernetzung mit B-Zell-Rezeptor (BCR). Die Aktivierung des Fc γ RIIb erfolgt durch die Quervernetzung von Immunkomplexen mit dem B-Zell-Rezeptor (BCR). Dies führt zur Phosphorylierung des „Immunoreceptor tyrosin-based inhibitory Motifs“ (ITIM). Die Phosphorylierung rekrutiert Moleküle wie zum Beispiel die SHIP-Phosphatase. Die SHIP-Phosphatase greift durch Hydrolyse von Phosphoinositid-Zwischenprodukten in aktivierende Signalwege ein. Dies verhindert die Rekrutierung weiterer Kinasen und hemmt so den Calcium (Ca²⁺) Einstrom ins endoplasmatische Retikulum. Des Weiteren wird die Transduktion der RAS-RAF-MAP-Kinasen gehemmt. Gleichzeitig wirkt die Phosphorylierung des ITIMs auf die aktivierenden Signalwege des BCRs ebenfalls modulierend (Nitschke und Tsubata, 2004). Auf B-Lymphozyten werden aktivierende Signale des BCR und hemmende Signale des Fc γ RIIb verrechnet. Dies moduliert den Schwellenwert zur Aktivierung der Zelle (modifiziert nach (Nimmerjahn und Ravetch, 2008)). B. Signalkaskade bei Selbstligation des Fc γ RIIb. Die Bindung des Immunkomplexes führt zur Phosphorylierung der ITIM-Sequenz. In der Folge wird über c-Abl die Apoptose der B-Lymphozyten/Plasmazellen eingeleitet (in Anlehnung an Li et al., 2003).

Für die Pathogenese der RA spielt sowohl die Expression des FcγRIIb auf B-Lymphozyten und DC als auch die Kontrolle der Zellaktivierung des angeborenen Immunsystems eine Rolle (Li et al., 2003; Nimmerjahn und Ravetch, 2006). Der FcγRIIb ist der einzige Rezeptor seiner Klasse, der auf B-Lymphozyten zu finden ist. Dort wird er mit dem B-Zell-Rezeptor (BCR) koexprimiert. Beide Rezeptoren werden durch die Bindung von Immunkomplexen aktiviert. Jedoch werden gegensätzliche Signalwege eingeleitet. Während über den BCR eine aktivierende Signalkaskade initiiert wird, wirkt der FcγRIIb mit den hemmenden Einflüssen als modulierender Gegenspieler. Das Zusammenspiel der Signalkaskaden von BCR und FcγRIIb entscheidet über den Werdegang der B-Lymphozyten (vergleiche Abbildung 4A.).

Ausgelöst wird die Rezeptorantwort durch die Bindung von Immunkomplexen. Es kommt zur Quervernetzung des BCR mit dem FcγRIIb. Der aktivierende BCR und der inhibierende FcγRIIb werden auf diese Weise koaktiviert. Das ITIM wird durch die Tyrosinkinase des BCR phosphoryliert. Dies induziert über eine Signalkaskade die Hydrolyse von Phosphatidyl-Inositol-(3, 4, 5)-Triphosphat. Nachfolgend wird die Rekrutierung weiterer Tyrosinkinase-Proteine unterbunden (Bolland et al., 1998). Die B-Lymphozyten können, in Abhängigkeit des FcγRIIb-Signals, proliferieren, einen Klassenwechsel durchlaufen oder bis zur Plasmazelle ausreifen.

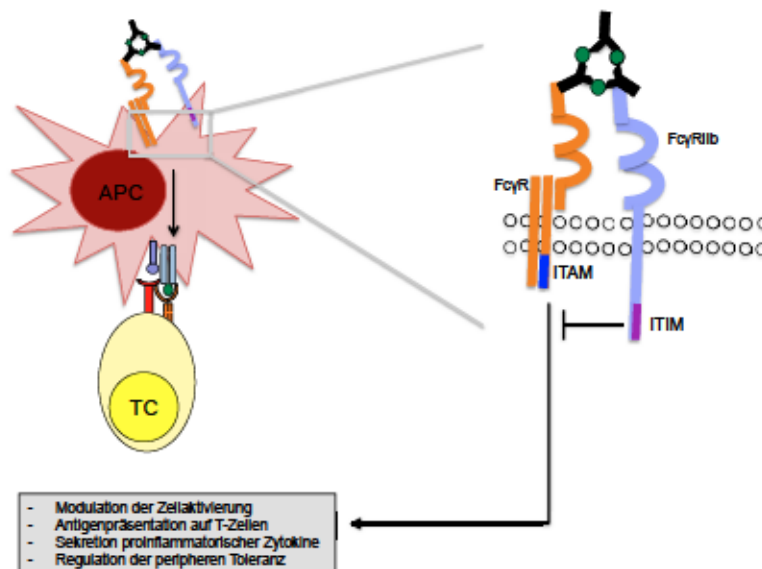


Abbildung 5: Koaktivierung aktivierender und hemmender FcγR mittels Immunkomplex. Die Abbildung links zeigt die APC abhängige Differenzierung der TC unter Einfluss aktivierender und hemmender FcR. Der Ausschnitt der Koexpression beider FcR ist im rechten Bild vergrößert dargestellt. Diese Abbildung verdeutlicht, dass die aktivierende Signalkaskade der FcR durch die Hemmung des FcγRIIb moduliert wird. Eine Dominanz der aktivierenden Signalkaskade fördert die Antigenpräsentation auf TC, steigert die proinflammatorische Immunreaktion und trägt zur Regulation der peripheren Toleranz bei. Abbildung in Anlehnung an (Nimmerjahn und Ravetch, 2008) erstellt.

Dominieren die hemmenden Einflüsse des Fc γ RIIb, werden die B-Lymphozyten in den jeweiligen Entwicklungsstadien in ihrer Proliferation und Differenzierung gehemmt (Boruchov et al., 2005; Dhodapkar et al., 2005). Binden Immunkomplexe simultan an zwei nebeneinanderliegende Fc γ RIIb, wird ebenfalls eine Phosphorylierung des ITIMs ausgelöst (vergleiche Abbildung 4B.). Die nachgeschaltete Signaltransduktion führt über einen c-Abl abhängigen Signalweg zur Apoptose der B-Lymphozyten in unterschiedlichsten Reifestadien (Li et al., 2003; Pearse et al., 1999). So können anhand der Fc γ RIIb-Expression autoreaktive B-Lymphozyten in der Peripherie aussortiert werden. Dies ist wesentlich für die Entwicklung der peripheren Toleranz der B-Lymphozyten (Li et al., 2003; Nimmerjahn und Ravetch, 2008; Steinman et al., 2003). Neben der Expression von Fc γ RIIb auf den B-Lymphozyten werden die Immunantwort sowie die Toleranzentwicklung auch durch die Expression der Rezeptoren auf DC reguliert. Die Expression des Fc γ RIIb kontrolliert bei diesen Zellen ebenfalls die Immunkomplex-vermittelte Differenzierung. Der Aktivierungsgrad der DC entscheidet über die antigenspezifische Antwort der T-Lymphozyten (Nimmerjahn und Ravetch, 2006; Steinman et al., 2003).

Die Expression des Fc γ RIIb auf den Zellen des angeborenen Immunsystems moduliert die efferente Phase der Immunreaktion. Auf Zellen des angeborenen Immunsystems werden aktivierende FcR mit dem hemmenden Fc γ RIIb koexprimiert. Die resultierende Immunreaktion hängt von der jeweils dominierenden Rezeptorfunktion ab. Überwiegt die aktivierende Signalkaskade der FcR durch Phosphorylierung der ITAMs, wird eine proinflammatorische Immunantwort eingeleitet (vergleiche Abbildung 5). Die Effektorzellen des angeborenen Immunsystems sezernieren vasoaktive Substanzen, fördern Chemotaxis und setzen zytotoxische Substanzen frei. Insbesondere bei DC wird die Phagozytose gefördert. Dies ermöglicht die Bekämpfung von Infektionen, fördert die Antigenpräsentation und die Interaktion mit T-Lymphozyten zur Unterhaltung der peripheren Immunreaktion (Nimmerjahn und Ravetch, 2008).

Die hemmenden Einflüsse, die durch Aktivierung des ITIM des Fc γ RIIb vermittelt werden, kontrollieren die Entzündungsreaktion. Bei der Interaktion von DC und T-Lymphozyten spielen das Gleichgewicht zwischen aktivierenden und hemmenden FcR sowie die adaptive Immunreaktion eine entscheidende Rolle für die Aktivierung der Zellen. Die FcR vermittelte Internalisierung von Immunkomplexen fördert die Dif-

ferenzierung von T-Effektorzellen. Die inhibierenden Einflüsse des FcγR IIb hingegen verhindern eine spontane Reifung der DC und versetzen T-Lymphozyten ohne kostimulatorische Signale in einen anergen Zustand. Fehlt der FcγR IIb, kommt es zur Anhäufung antigenspezifischer T-Lymphozyten (Dhodapkar et al., 2005; Steinman et al., 2003).

Anhand der physiologischen Funktion des FcγR IIb lässt sich ableiten, dass der Verlust oder Funktionseinbußen des FcγR IIb zu einem Ungleichgewicht der Immunantworten sowie zum Bruch der peripheren Toleranzentwicklung führen. Dadurch können B-Lymphozyten ungehindert zu antikörperproduzierenden Plasmazellen differenzieren. Gleichzeitig können DC effizienter internalisierte Antigene präsentieren und die antigenspezifische Antwort der T-Lymphozyten fördern (McGaha et al., 2008; Sato-Hayashizaki et al., 2011).

2.3 Genetische Polymorphismen des *FCGR2b*

Für den FcγR IIb sind mehrere Mutationen entdeckt worden. Primär handelt es sich dabei um Punktmutationen. Funktionale Konsequenzen sind für die Punktmutationen im Promotor und im Transmembranexon beschrieben worden. Für den Promotorpolymorphismus (G<C rs3219018) werden in der Literatur eine reduzierte Transkription der Promotorregion und eine verminderte Expression des FcγR IIb auf B-Lymphozyten als Folge des Polymorphismus erwähnt (Blank et al., 2005). Der Transmembran-Polymorphismus (T<C rs1050501) resultiert in einer verminderten Integration des Rezeptors in die Lipid-Doppelschicht. Dies führt zu einer Beeinträchtigung der Signaltransduktion (Chen et al., 2008; Kono et al., 2005; Li et al., 2003). Für beide Polymorphismen sind Assoziationen mit Autoimmunerkrankungen beschrieben. Die Autoren Blank et al. und Su et. al haben festgestellt, dass durch Veränderungen in der Promotorregion eine Assoziation mit der Autoimmunerkrankung SLE bestehe (Blank et al., 2005; Su et al., 2004b). Bei Veränderungen im Abschnitt des Transmembran-Exons ist neben einem gehäuftem Auftreten des SLE auch eine vermehrte Gelenkdestruktion bei Patienten mit RA beschrieben worden (Chen et al., 2008; Kono et al., 2005; Radstake et al., 2006).

2.3.1 Promotor Polymorphismus

Die Promotorregion des *FCGR2b*-Gens umfasst 2kb und ist u.a. von Su et al. untersucht worden. Die Arbeitsgruppe hat zehn Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs) entdeckt (Su et al., 2004b). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit werden die Assoziationen mit dem Vorkommen des SNPs (rs3219018) an Position -386 untersucht. An dieser Stelle der DNA kann entweder Guanin (G) oder Cytosin (C) lokalisiert sein. Die Base „G“ entspricht dem Wildtyp oder dem häufigen Allel. Hingegen steht die Base „C“ für ein seltenes Allel beziehungsweise die Allelvariante (Blank et al., 2005; U.S. National Library of Medicine, 2014a).

Der Polymorphismus ist in der Region für die Bindungselemente der Transkriptionsfaktoren lokalisiert. Bedingt durch den Basenaustausch wird eine verminderte Affinität zum Transkriptionsfaktor AP-1 beschrieben. AP-1 ist ein Transkriptionsfaktor, der als Antwort auf Entzündungsmediatoren für eine gesteigerte Expression bestimmter Gene sorgt, wie in diesem Fall dem *FCGR2b*-Gen. Die verminderte Affinität des Transkriptionsfaktors zum Promotor führt zu einer reduzierten Expression des *FCGR2b*-Gens. Bei der Untersuchung des SLE konnte ein direkter Zusammenhang zwischen dem homozygoten Vorliegen des seltenen Allels im Promotorabschnitt und der Entstehung des SLE gezeigt werden (Blank et al., 2005). Der Zusammenhang und die Auswirkungen des Promotor-Polymorphismus auf das Krankheitsbild der RA sind bislang in der europäischen Bevölkerung nicht erforscht worden.

2.3.2 Transmembran Polymorphismus

Der kodierende Abschnitt der DNA zur Untersuchung des TM-Polymorphismus des *FCGR2b*-Gens (rs1050501) ist auf Exon 7 lokalisiert. An Position 695 des DNA-Abschnitts kann entweder die Base Thymin (T) oder die Base Cytosin (C) vorliegen. Hier entspricht die Base „T“ dem Wildtyp oder dem häufigen Allel, während die Base „C“ für das seltene Allel oder die Allelvariante steht (U.S. National Library of Medicine, 2014b). Im Protein des Rezeptors wird dadurch an Position 187 die Aminosäure Isoleucin statt Threonin eingebaut. Durch diese Allelvariante wird die Signalkaskade des FcγRIIb bei Koaktivierung mit dem BCR beeinflusst. Bedingt durch den Aminosäureaustausch wirkt die hemmende Signalkaskade des FcγRIIb auf die B-Lymphozyten, DC oder andere Effektorzellen des angeborenen Immunsystems weniger hemmend (Li et al., 2003). Kono et al. erklären die abgeschwächte Funktion

des FcγRIIb durch eine abweichende Anordnung von Lipid Rafts in der Plasmamembran. Dies führt zu einer verminderten Integration des Rezeptors in die Phospholipid-Doppelschicht sowie zu einer abweichenden Anordnung auf der Zelloberfläche. Nachfolgend kann die reguläre Signalkaskade nicht adäquat ausgelöst werden, so dass es zu einer ineffizienten Regulation der Immunreaktionen kommt (Floto et al., 2005; Kono et al., 2005). Auf den Signalweg der Apoptose resultiert bei Vorliegen des seltenen Allels kein signifikanter Einfluss (Li et al., 2003). Wie in Kapitel 2.2 beschrieben, führt ein Funktionsverlust des FcγRIIb zu einer verminderten Kontrolle der peripheren Toleranzentwicklung der B-Lymphozyten. Ebenfalls hat dies eine verminderte Kontrolle der Antikörperproduktion zur Folge. Bei Vorliegen einer Dysfunktion des FcγRIIb kommt es deshalb zur verstärkten Immunreaktion sowie zu einer erleichterten Aktivierung autoreaktiver Effektorzellen (Floto et al., 2005). Patienten mit TM-Polymorphismus weisen eine Korrelation mit der Autoimmunerkrankungen SLE auf. Patienten mit dieser Erkrankung sind gehäuft Träger des seltenen Allels im TM-Exon (Kono et al., 2005). Weitere Untersuchungen haben ergeben, dass das Vorkommen der Allelvariante im TM-Exon abhängig von der ethnischen Herkunft ist. Bei Europäern tritt der TM-Polymorphismus sehr selten auf und liegt nur in einem geringen Prozentsatz homozygot vor (U.S. National Library of Medicine, 2014b). Gleichzeitig erkranken Europäer vergleichsweise selten an einem SLE (Kono et al., 2005; Willcocks et al., 2010). Hingegen tragen Bevölkerungsgruppen mit asiatischer Abstammung häufiger ein seltenes Allel im Transmembranabschnitt. Im Vergleich zu Europäern oder Afro-Amerikanern liegt ein seltenes Allel bei Asiaten deutlich häufiger in homozygoter Ausprägung vor (U.S. National Library of Medicine, 2014b). Ebenfalls besteht in dieser Bevölkerungsgruppe ein vermehrtes Vorkommen des SLE (Willcocks et al., 2010). Afro-Amerikaner tragen das seltene Allel am häufigsten in heterozygoter Ausprägung. Sie weisen den höchsten Prozentsatz für das Vorliegen der Allelvariante im TM-Exon auf (U.S. National Library of Medicine, 2014b). Für die afrikanische Bevölkerung konnte in Studien gleichermaßen eine gehäufte Assoziation mit dem SLE nachgewiesen werden (Clatworthy et al., 2007; Willcocks et al., 2010). Berücksichtigt man die Verteilung der Allelvariante in den ethnischen Gruppen, fällt auf, dass sie gehäuft in Bevölkerungsstämmen auftritt, in denen die Malaria eine Rolle spielt. Somit kann die Allelvariante in diesen Bevölkerungsgruppen einen evolutionären Vorteil

geboren haben. Diese Vermutung wird durch das gehäufte Vorkommen des TM-Polymorphismus in Malaria-Endemiegebieten bestätigt (Willcocks et al., 2010).

Untersuchungen der seltenen Allelvariante im TM-Exon weisen im Zusammenhang mit der RA auf eine stärkere Gelenkdestruktion im Krankheitsverlauf hin (Radstake et al., 2006). Dennoch gibt es bislang keine detaillierten Kenntnisse über die Rolle des Fc γ RIIb in der Pathogenese der RA (Catalan et al., 2010; Mauri und Jury, 2010).

2.4 Hypothese

Die hier adressierten Transmembran- und Promotorpolymorphismen im *FCGR2b*-Gen führen zu einer Abschwächung der Funktion des Proteins und somit zu einer Störung der Immuntoleranz (Blank et al., 2005; Chen et al., 2008; Kono et al., 2005). Da für den SLE als Prototyp der systemischen Autoimmunerkrankungen eine Korrelation mit Polymorphismen im *FCGR2b* bereits bestätigt worden ist (Blank et al., 2005; Kono et al., 2005), ergeben sich für die vorliegende Arbeit folgende Hypothesen:

1. Die RA, als weitere durch Autoantikörper vermittelte Autoimmunerkrankung, weist ebenfalls eine Assoziation mit Polymorphismen im FCGR2b-Gen auf.
2. RA Patienten, die einen *FCGR2b*-Polymorphismus (also ein seltenes Allel des Gens) tragen, können klinisch und laborchemisch von Wildtyp-Trägern (das häufige Allel) unterschieden werden.
3. Die Anwesenheit von Transmembran- oder Promotorpolymorphismus korreliert mit einer spezifischen Expression von Oberflächenproteinen auf Lymphozyten.

3 Material und Methoden

3.1 DNA-Isolierung aus Blutproben

Die zu untersuchende DNA wurde aus Blutproben von allen Patienten der rheumatologischen Sprechstunde des Südstadt-Klinikums in Rostock isoliert. Dazu wurde das Isolations-Kit von Qiagen verwendet. Wie im Herstellerprotokoll vermerkt, wurde in 15 ml Röhrchen ein Gemisch aus 200 µl Protease, 1000 µl Blut der Patienten, 800 µl PBS und 2400 µl AL Buffer hergestellt. Nach 15-fachem Invertieren des Röhrchens und einminütigem Schütteln wurde das Gemisch 15 Minuten bei 70°C und 750 rpm im Thermocycler inkubiert. Anschließend wurden 2000 µl Ethanol zugegeben. Das Gemisch wurde sorgfältig mittels 10-fachem Invertierens und kräftigen Schüttelns vermengt. Aus den 15 ml Röhrchen wurde die Hälfte auf die QIAamp Midi Säule gegeben und 3 Minuten bei 1850 x g zentrifugiert. Mit der zweiten Hälfte wurde dieser Arbeitsschritt wiederholt. Der Durchfluss wurde verworfen. Im folgenden Arbeitsschritt wurde auf die Säule 2000 µl AW1 Buffer gegeben. Dies wurde für 1 Minute bei 4500 x g zentrifugiert. Nun wurden 2000 µl AW2 Buffer hinzugegeben und für 15 Minuten bei 4500 x g zentrifugiert. Im Anschluss wurde die QIAamp Midi Säule in ein neues Röhrchen gesetzt. Auf die Säule wurden 300 µl HPLC-Wasser pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten wurde das Gemisch für 2 Minuten bei 4500 x g zentrifugiert. Dieser Arbeitsschritt ist nochmals wiederholt worden. Dabei enthielt der Durchfluss nach der Zentrifugation die DNA und wurde weiter verwendet. Zur Quantifizierung und Qualitätskontrolle des DNA Templates wurde das Nanodrop 1000 Spektrometer von Thermo Scientific verwendet.

3.2 Amplifikation des *FCGR2b* Rezeptorfragments

Zur Amplifikation des genspezifischen DNA-Abschnittes wurden die in Tabelle 1 aufgeführten Materialien verwendet.

Für den jeweiligen Nucleotid-Polymorphismus wurden die entsprechenden Primer aus Tabelle 2 in Gebrauch genommen. Sie amplifizierten entweder den Promotor oder das TM-Exon im Gen des *FCGR2b*. Das Gen des *FCGR2b* unterscheidet sich nur in wenigen Basen vom kodierenden Gen des *FCGR2c*.

Tabelle 1: Chemikalien zur Amplifikation des 2,3kb Fragments

Komponenten	25µl Reaktion	finale Konzentration
5x LongAmp Taq Reaction Buffer	5 µl	1x
10 mM dNTPs	0.75 µl	300 µM
10 µM Primer (5'/3'-Mix)	Je 0.5 µl	Je 0.2 µM (0.05-1 µM)
Template DNA	variable	200-400 ng
Nuclease-free water	to 25 µl	
LongAmp Taq DNA-Polymerase	1 µl	2.5 units

Für die eindeutige Amplifikation des *FCGR2b*-Gens binden die Primer gezielt DNA-Positionen mit Sequenzunterschieden zum *FCGR2c*-Gen. Die Amplifizierung des TM-Exons wird durch den Sequenzunterschied des TM-sense-Primers an Positionen 16 und 21 verifiziert. Die kodierenden Basen „C“ und „T“ sind an dieser Stelle spezifisch für das *FCGR2b*-Gen. Die Primer-Hybridisierung zur Amplifikation des Promotors erfolgte spezifisch für das *FCGR2b*-Gen mit Hilfe des Sequenzunterschiedes an den Primer-Positionen 22 und 23. Der Ansatz für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde in 0,2 ml Reagenzbehälter pipettiert. Die anschließende PCR wurde unter den in Tabelle 3 aufgelisteten Bedingungen im Thermocycler (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) durchgeführt.

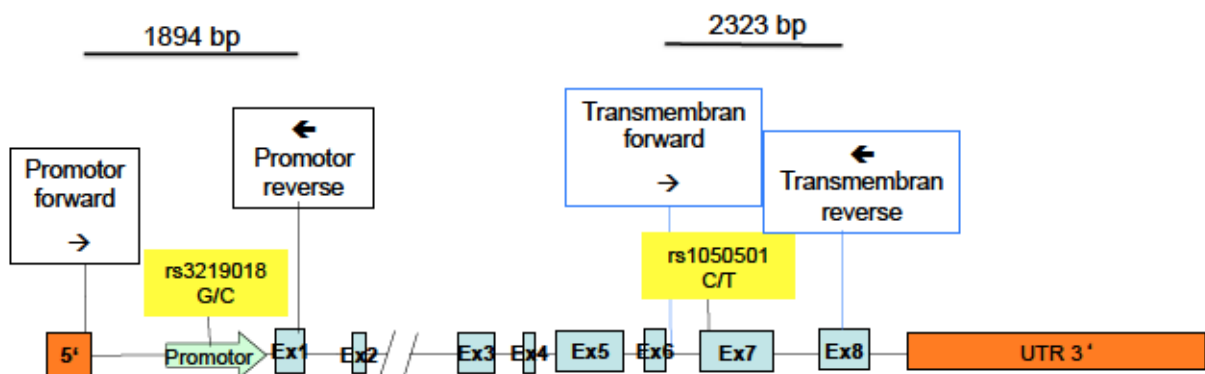


Abbildung 6: Lage der Primer zur Amplifikation von Promotor und Transmembran-Exon. Die Amplifikation des Promotorabschnitts in Leserichtung erfolgt mit dem Primer „Promotor forward“. In die entgegengesetzte Richtung amplifiziert der Primer „Promotor reverse“. Das zu amplifizierende Fragment hat eine Länge von 1894 Basenpaaren (bp). Der Transmembranabschnitt wird mit Hilfe der Primer „Transmembran forward“ in 5'-3' Richtung und durch den Primer „Transmembran reverse“ in die entgegengesetzte Leserichtung amplifiziert. Dieses Fragment ist 2323 bp lang.

Tabelle 2: Primer für PCR Fragment

SNP	Primer	5'-3' Sequenz	C in Stock- lösung	C in 25µl
TM-Exon	TM forward	AAGGGGAGCCCTTCC CT CTGT T	100 µM	0,2 µM
	TM reverse	GTGGCCCCTGGTTCTCAGAA	100 µM	0,2 µM
Promotor	Promotor forward	CAATTTACCGAGAGCAAGACAG C	100 µM	0,2 µM
	Promotor reverse	GCAGTCAGCCCAGTCACTCTCAGT	100 µM	0,2 µM

Kursiv und fett gedruckte Basen dienen der Differenzierung zwischen FcγRIIb und FcγRIIc bei der Primer-Hybridisierung.

Tabelle 3: PCR-Protokoll

Arbeitsschritt		Temperatur	Dauer
Initiale Denaturierung		94°C	5 min
30 Zyklen	1. Denaturierung	94°C	30 sek
	2. Primer-Hybridisierung	58°C	1 min
	3. Strang-Verlängerung	65°C	12,5 min (50sek/kb)
Synthetisierungsphase		65°C	10 min
Halten		4°C	∞

3.3 Sequenzierung nach Sanger

Sanger hat die Didesoxymethode bzw. die Kettenabbruchreaktion 1975 entwickelt und 1977 die erste vollständige Sequenzierung mittels dieser Methode durchgeführt. Die zu amplifizierende DNA wird jeweils mit einem Vorwärts- /Rückwärts-Primer, Desoxy-Nukleotid-Triphosphaten (dNTPs) und fluoreszierenden Didesoxy-Nukleotid-Triphosphaten (ddNTPs) angesetzt. Nach dem Prinzip der PCR wird die Einzelstrang-DNA verlängert. Kommt es bei der Synthese zum Einbau der ddNTPs, die im Gegensatz zu den dNTPs keine 3' OH-Gruppe besitzen, so wird eine weitere Synthese des Stranges verhindert, da keine weitere Phosphodiesterbindung zu einem weiteren Nukleotid möglich ist. Demzufolge kommt es zum Kettenabbruch.

Die Konzentration der dNTPs ist um das 10-fache höher als die der ddNTPs, so dass unterschiedlich lange DNA-Fragmente entstehen. Zur Differenzierung der unter-

schiedlichen Basen (Adenin, Guanin, Thymin und Cytosin) sind die ddNTPs mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Mittels Kapillar-Gelelektrophorese werden die Produkte der Sequenzreaktion nach ihrer Größe aufgetrennt und analysiert. Die DNA Fragmente unterschiedlicher Länge differieren in ihrer Fluoreszenz aufgrund der ddNTPs am Ende. Die fluoreszierenden Fragmente werden bei unterschiedlichen Wellenlängen detektiert.

3.3.1 Aufreinigung des PCR-Produktes

Als Ausgangsmaterial wurde das PCR-Produkt des *FCGR2b* Fragments verwendet (vgl. Kapitel 3.2). Die Aufreinigung des PCR-Produktes erfolgte mittels Invisorb Fragment CleanUp Kit (REF 1020300200; Stratec, Berlin, Deutschland) und diente der Entfernung von überschüssigen Nukleotiden. Die Vorgehensweise gestaltete sich wie folgt: Als erstes wurde das PCR-Produkt mit 250 µl Invisorb Bindepuffer versetzt und auf ein Spin-Filter Reagenz gegeben. Im zweiten Schritt wurde das Gemisch zentrifugiert und der Spin Filter anschließend auf ein neues Reagenzgefäß gesetzt. Dem Gemisch im Reagenzgefäß wurden 2/3 des ursprünglichen Volumens Invisorb Elutionspuffer hinzugefügt. Nachfolgend wurde das Produkt 5 Minuten inkubiert und dann zentrifugiert. Der nächste Arbeitsschritt diente der Ermittlung der amplifizierten Menge des jeweiligen PCR-Produktes. Dazu wurde je 1 µl des aufgereinigten PCR-Produktes mit je 1 µl 10fach Loading dye und destilliertem Wasser aufbereitet, so dass ein Endvolumen von 10 µl vorlag. Die Quantifizierung erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Dazu wurde ein 0,7%iges Agarosegel (1 g Agarose, 150 ml 1x TAE, 3 µl Ethidiumbromid) hergestellt. Als Größenstandard wurde für den Vergleich des DNA-Gehaltes der Lambda HindIII/phiX HaeIII- Marker verwendet, für den die DNA Menge in den Banden bekannt war. Das Gel lief in einer Kammer mit 1-fach TAE-Puffer und Ethidiumbromid bei 130 Volt. Im Anschluss wurde das Gel fotografiert. Abschließend erfolgte die Bestimmung des DNA-Gehaltes im PCR-Produkt anhand der mit UV-Licht erstellten Fotos und der Angaben des Standard Markers. Dies war für den nachfolgenden Arbeitsschritt maßgeblich.

3.3.2 Sequenzierungsreaktion

Tabelle 4: Primer zur Sequenzreaktion

SNP	Bezeichnung	5'-3' Sequenz	Template-menge
TM- Exon	TM-forward	AAGGGGAGCC CTT CCCTCTG TT	100ng
	TM-antisense	CATCACCCACCATGTCTCAC	150ng
Promotor	Promotor-sense	TGACATACCTCCTTGTCCCTTGTT	150ng
	Verification Promotor	TGGAGATGTTGAGGGTGAAC	150ng
	Promotor-antisense	ACTCCCTTCTTCTTCCTCTGAG	100ng

Basen, die kursiv und fett markiert sind, dienen der Differenzierung zwischen FcγRIIb und FcγRIIc bei der Primer-Hybridisierung.

Das gereinigte PCR Produkt (siehe 3.3.1) wurde im Anschluss für die Sequenzierungsreaktion genutzt. Dafür wurde der GenomeLab™ Dye Terminator Cycle Sequencing (DTCS) Quick Start Master Mix (Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland) verwendet. Je nach zu untersuchendem DNA-Abschnitt wurden die Primer aus Tabelle 4 mit jeweils 2 µl hinzugefügt. Für die Sequenzierungsreaktion wurden 25-100 fmol des PCR-Produktes sowie 2 µl des jeweiligen Vorwärts- oder Rückwärts-Primers zu 8 µl des DTCS Quick Start Master Mix pipettiert und auf ein Endvolumen von 20 µl mit HLPC-Wasser ergänzt.

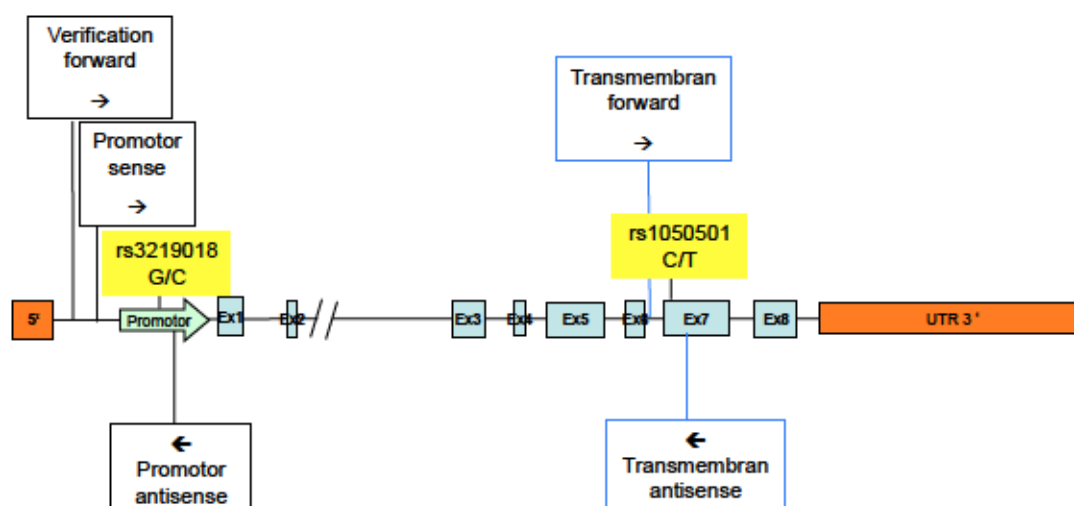


Abbildung 7: Schematische Anordnung der Primer zur Sequenzierung. Die Amplifikation mittels des Primers „Verification Promotor“ dient der Identifizierung des *FCGR2b*-Gens. Die Primer „Promotor sense“ und „Promotor antisense“ amplifizieren den DNA-Abschnitt des Promotors in beide Richtungen. Das Transmembran-Exons im *FCGR2b*-Gen wird durch die Primer „TM-forward“ und „TM-antisense“ amplifiziert. Die Reaktionsprodukte werden für die anschließende Sequenzierungsreaktion genutzt.

In diesem Endvolumen betrug die Konzentration der Primer 3,2 μM . Das Gemisch wurde in den Thermocycler (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) geladen und durchlief insgesamt 35 Zyklen: 1. Denaturierung bei 94°C für 20 Sekunden, 2. Primerhybridisierung bei 50°C für 20 Sekunden und 3. Strangverlängerung bei 60°C für 4 Minuten. Nach Abschluss der 35 Zyklen wurde die Temperatur bei 4°C gehalten, bis das Gerät abgeschaltet und die Proben entnommen wurden.

3.3.3 Ethanolpräzipitation

Nach erfolgter Sequenzierungsreaktion wurde jedes Produkt mit einer frisch hergestellten Stopp-Lösung/Glykogen-Mix (2 μl 3 M Natrium-Acetat (pH 5,2), 2 μl 100 mM Natrium-EDTA (pH 8,0), 1 μl 20 mg/ml Glykogen) und mit 60 μl eiskaltem 95%igem Ethanol gewaschen. Das Gemisch wurde für 15 Minuten in der Biofuge fresco (Heraeus, Newport, England) bei 13000 U/min und 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand mittels Pipette abgenommen. Ein Pellet sollte sichtbar sein. Das Pellet wurde zweimal mit je 200 μl kaltem 70%-igem Ethanol gewaschen. Bei diesem Arbeitsschritt wurde das Gemisch jeweils 5 Minuten bei 13000 U/min zentrifugiert und der Überstand in beiden Fällen mit Hilfe einer Pipette entfernt. Das Pellet wurde bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend in 40 μl Sample Loading Solution (SLS) (GenomeLab™ von Beckmann Coulter, Krefeld, Deutschland) resuspendiert.

3.3.4 Sequenzierung mittels kapillarer Gelelektrophorese

Die gelösten Produkte der Sequenzierungsreaktion wurden in eine 96-Well-Platte (Sample Plate (P/N 609801)) gegeben und mit einem Tropfen Mineralöl (GenomeLab™) überschichtet. Eine weitere Platte wurde mit Separations-Puffer (GenomeLab™) in den zu sequenzierenden Reihen befüllt. Beide Platten wurden in das automatisierte genetische Analysesystem CEQ 8800 (Beckmann Coulter, Krefeld, Deutschland) geladen und mit Hilfe des Elektrophorese-Programms „LFR-1“ analysiert. Die Kapillaren des Geräts wurden mit Gel befüllt und konnten so die einzelsträngige DNA elektrophoretisch auftrennen und über einen Fluoreszenzdetektor erfassen.

3.3.5 Auswertung der Sequenzreaktion

Nach Abschluss der Sequenzierung wurden die erhobenen Daten auf die entsprechenden Basenabfolgen in den gewünschten DNA-Abschnitten analysiert. Dafür wurde das Programm „Genome Lab – Sequenzierung“ benutzt. Anhand der bildlichen Darstellung (Ausprägung der Wellenform) der fluoreszenzmarkierten Basen wurde die Qualität der Sequenzierung beurteilt. Im nächsten Schritt wurde die Basensequenz manuell kontrolliert. Anhand der Basensequenz konnte sowohl zwischen der Basenabfolge der Gene *FCGR2b* und *FCGR2c* differenziert werden als auch die Allelausprägung an den SNP-Positionen festgestellt werden. Die jeweilige Allelausprägung im TM-Exon und Promotor wurde anhand der Basenabfolge des Vorwärts- und Rückwärtsstranges identifiziert. Mittels Sequenzierung der Einzelstränge war eine Aussage über den Genotyp der vorliegenden Allelkombination auf dem jeweiligen Locus möglich.

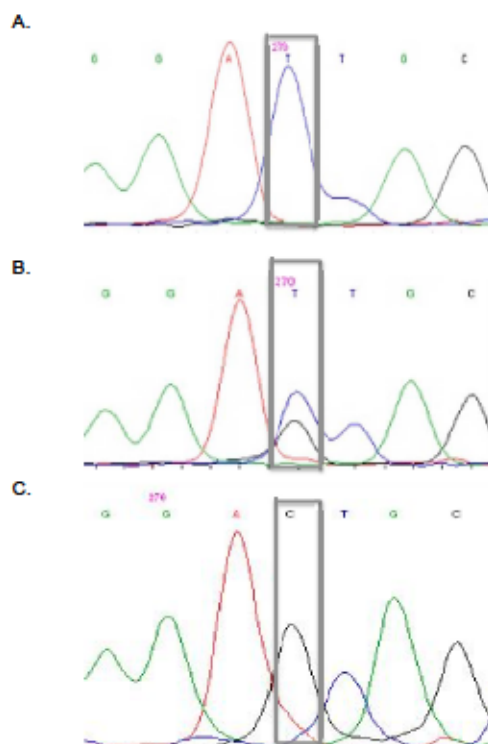


Abbildung 8: Visuelle Darstellung der Sequenzierungsreaktion im Basenabschnitt des TM-Exons an der Stelle der Allelvariante (695 T>C; rs1050501) mit dem Primer „Transmembran forward“. A zeigt die Basenabfolge des TM-Exons mit homozygoter Ausprägung des häufigen Allels „T“. B zeigt die Basenabfolge im TM Exon mit heterozygoter Ausprägung des seltenen Allels mit den Basen „T“ und „C“. C zeigt die Basenabfolge des TM-Exons mit homozygoter Ausprägung des seltenen Allels „C“. Die Position der Allelvariante im TM-Exon ist mit einem Rahmen markiert.

3.4 Externe Daten

Die Daten der Durchflusszytometrie (FACS Aria II; BD, Deutschland) zur Quantifizierung der Oberflächenmarker CTLA-4, CD127, CD25, CD4, GITR, CD80, CD86 und FOXP3 wurden von dem Institut für Immunologie der Universität Rostock zur Verfügung gestellt. Dies gilt ebenfalls für die verwendeten Daten der ACPA ELISA und Serumkonzentrationen der Zytokine (Engelmann et al., 2014).

3.5 Statistische Analyse

Die Allelfrequenz und Genotypverteilung wurde mit Hilfe des Hardy-Weinberg-Gleichgewicht-Modells auf populationsgenetische Gesichtspunkte überprüft.

Alle Daten wurden in den jeweiligen Gruppen auf Normalverteilung getestet. Dazu ist der Shapiro-Wilk Test verwendet worden, da dieser eine hohe Teststärke für kleine Stichproben ($n < 50$) aufweist. Lag der p-Wert $< \alpha = 0,05$, so waren die Daten nicht normalverteilt (Bortz und Schuster, 2010). Bei einem p-Wert $> \alpha = 0,05$ war eine Normalverteilung gegeben. Normalverteilte Datensätze wurden mit dem t-Test für unabhängige Stichproben analysiert. Dieser diente der Feststellung signifikanter Unterschiede zwischen Trägern eines seltenen Allels im TM-Exon oder der Promotorregion zu Trägern ausschließlich häufiger Allele in diesen Regionen. Folgt den Datensätzen keine Normalverteilung, wurde zum Vergleich der Gruppe mit ausschließlich häufigen Allelen gegenüber der Gruppe mit einem seltenen Allel für die Berechnung der p-Werte der Mann-Whitney-U-Test durchgeführt.

Die Analyse von Häufigkeitsverteilungen zwischen Trägern des seltenen und des häufigen Allels erfolgte mittels des Chi-Quadrat-Tests (medikamentöse Therapie) oder des exakten Fisher-Tests (Nachweis IL6 und IL10).

Bei allen Analysen wurde ein p-Wert $< \alpha = 0,05$ als signifikant angenommen. Alle Berechnungen und Abbildungen wurden mit Hilfe von GraphPad Prism 6.0 erzeugt.

4 Ergebnisse

4.1 Charakteristika der Patientengruppen

Tabelle 5: Gruppeneinteilung für häufiges Allel und seltenes Allel

Gruppeneinteilung	Genotyp	n	%
Ausschließlich häufige Allele im TM-Exon und Promotor	„TT“ u. „GG“	50	47,6
Mindestens ein seltenes Allel im TM-Exon oder Promotor	„TC“ o. „GC“ o. „CC“	38	36,2
ausgeschlossen		17	16,2
Gesamtsumme		105	100

Für die Analyse wurden 105 Patientenproben untersucht. Bei n= 88 Patientenproben konnte die DNA am kodierenden Abschnitt des *FCGR2b*-Gens für den Transmembran (rs1050501 (695 T>C)) - und Promotorpolymorphismus ((rs3219018 (-386 G>C)) sequenziert werden, so dass die Proben in die Datenerhebung eingeschlossen werden konnten. Von der Untersuchung ausgeschlossen (n=17) wurden alle nicht eindeutig sequenzierten Proben. Die Ergebnisse der Sequenzierung stellten die Grundlage für die Aufteilung in die Untersuchungsgruppen dar. Abbildung 9 zeigt die Aufteilung der Untersuchungsproben in die Gruppen „Träger ausschließlich häufiger Allele“ und „Träger eines seltenen Allels“. Die Zuordnung in die Gruppe der häufigen Allele erfolgte, wenn sichergestellt werden konnte, dass weder im TM-Exon noch im Promotor die Allelvariante zu finden war. Probanden wurden der Gruppe „Träger eines seltenen Allels“ zugeteilt, wenn die Allelvariante entweder im TM-Exon oder im Promotor vorlag. Zum Vergleich stellt Tabelle 5 sowohl die Aufteilung inklusive Angaben der Genotypen als auch die Anzahl (n) der Patienten in den jeweiligen Gruppen und die prozentuale Verteilung dar.

Als Ergänzung wurden die Probanden der Gruppe „seltenes Allel im TM-Exon oder Promotor“ für einige Untersuchungen spezifisch nach Lage der Polymorphismen un-

terteilt. Die Einteilung in die Gruppe „seltenes Allel im TM-Exon“ erfolgte bei Nachweis der Allelvariante im TM-Exon und Wildtyp im Promotor. Lag ein seltenes Allel im Promotor und wies das TM-Exon den Wildtyp auf, wurden die Probanden in die Gruppe „seltenes Allel Promotor“ eingeteilt. Bei Ausprägung des seltenen Allels im TM-Exon und Promotor erfolgte die Einteilung in die Gruppe „seltenes Allel im TM-Exon und Promotor“. Für die Zuordnung in die Gruppe „häufiges Allel“ galt weiterhin, dass auf beiden DNA-Abschnitten die häufigen Allele ausgeprägt sein mussten. Aus diesen Kriterien ergibt sich die in Abbildung 9 aufgeführte schematische Darstellung der Gruppeneinteilung inklusive differenziertem Trägerstatus der Allele. Für die Berechnung der Allelfrequenzen aus den Genotypen der einzelnen Patientenproben sind die Ergebnisse isoliert für das TM-Exon und den Promotor ausgewertet worden. Die Sequenzierung des TM-Exons (n= 95) wies in 87% der Fälle eine Expression von Thymin (T) und in 13% eine Expression von Cytosin (C) auf. Dies resultierte aus folgender Verteilung der Genotypen: 79% (n=75) homozygot für das häufige Allel (T), 16% (n=15) heterozygot und 5% (n=5) homozygot für ein seltenes Allel (C) im TM-Exon.

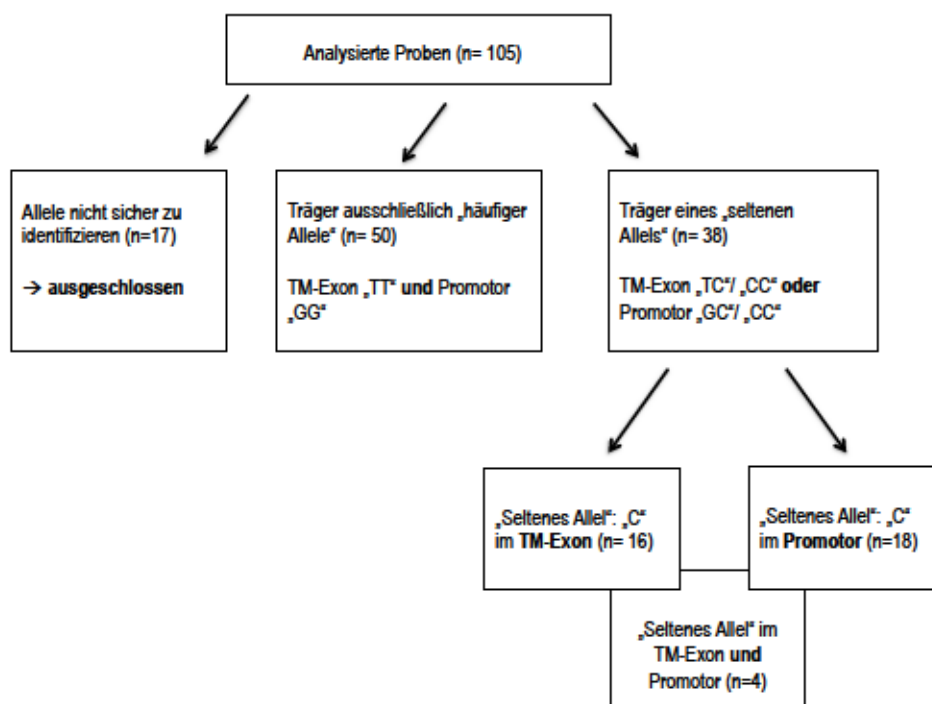


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Gruppeneinteilung. Es standen 105 Patientenproben zur Verfügung. Davon wurden n= 17 ausgeschlossen, da keine eindeutige Identifizierung der Allele möglich war. Als Träger ausschließlich „häufiger Allele“ im TM-Exon und Promotor konnten n= 50 identifiziert werden. Träger eines „seltenen Allels“ im TM-Exon oder im Promotor waren n= 38. Isoliert wiesen n= 16 ein seltenes Allel im TM-Exon auf, während bei n= 18 die Allelvariante im Promotor lag. Von allen Trägern eines seltenen Allels wiesen n=4 die Allelvariante sowohl im TM-Exon als auch im Promotor auf.

Die Sequenzierung des Promotors (n=94) ergab folgende Verteilung der Genotypen: 77% (n= 72) homozygot für das häufige Allel (G), 22% (n=21) heterozygot und 1% (n= 1) homozygot für ein seltenes Allel (C). Die daraus resultierende Allelfrequenz zeigte für den Promotor in 88% der Fälle eine Expression der Base Guanin (G) und in 12% der Base Cytosin (C).

Isoliert betrachtet, waren von insgesamt 105 analysierten Proben 10 für das TM-Exon in der Sequenzierung nicht auswertbar. Die Sequenzierung des Promotors war bei 11 Patientenproben nicht möglich, so dass diese aus der Berechnung der Allelfrequenz ausgeschlossen wurden. Die Genotypverteilung bei Allelvariante im TM-Exon weicht vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht ($p=0,003$) ab, während die Allelausprägung im Promotor nach Hardy-Weinberg im Gleichgewicht ($p=0,696$) liegt. Für den im TM-Exon gelegenen Polymorphismus ist die von uns bestimmte Genotypverteilung vergleichbar mit der von Radstake et. al beschriebenen Verteilung (Radstake et al., 2006). Die Verteilung der Allelvariante im DNA-Abschnitt des Promotors entspricht bei unserer Kohorte der Allelfrequenz einer gesunden europäischen Bevölkerung (Blank et al., 2005). Vergleichbare Literatur, die spezifisch für europäischen RA-Patienten die Genotypfrequenz angibt, liegt derzeit nicht vor.

4.2 Trend zur Basistherapie der RA bei Patienten mit einem seltenen Allel

Die Leitlinien gerechte Therapiestrategie der RA beginnt mit der Basistherapie. Hier kommen sogenannte DMARDs zum Einsatz. Als Komedikation können Steroide hinzugezogen werden. Wird durch diese Basistherapie kein zufriedenstellendes Ergebnis erreicht, kommen Biologika als erweiterte Therapiemaßnahme zum Einsatz (Wollenhaupt et al., 2009).

In Abbildung 10 ist die Verteilung der medikamentösen Therapiemaßnahmen in der untersuchten Kohorte dargestellt. Bei Vorliegen von ausschließlich häufigen Allelen erfolgt die Behandlung in 66% der Fälle mit Biologika (n=31). Nur 34% (n=16) der Probanden bekommen die Basistherapie. Sind die Patienten Träger eines seltenen Allels, erhalten 46% (n= 16) die erweiterte Therapie mit Biologika und 54% (n= 19) werden mit DMARDS/Steroide behandelt.

In Summe zeigt sich ein Trend zur anteilig häufigeren Anwendung von Biologika bei Probanden mit ausschließlich häufigem Allel im Vergleich zu Trägern eines seltenen Allels. Der Chi-Quadrat-Test liefert diesbezüglich keinen signifikanten Unterschied ($p\text{-Wert} = 0,067$). Demnach findet sich aus statistischen Gesichtspunkten kein Beleg dafür, dass Patienten mit Ausprägung eines seltenen Allels eine andere medikamentöse Therapie erhalten als Patienten, die ausschließlich häufige Allele tragen. In diesem Fall ist lediglich der Trend zu beobachten, dass Probanden mit Ausprägung eines seltenen Allels seltener das Spektrum der erweiterten Therapie mit Biologika ausschöpfen müssen.

In diesem Zusammenhang sind auch die jeweils applizierten Steroiddosen in beiden Gruppen miteinander verglichen worden (keine Abbildung). Die Steroiddosis ist bei 36 Probanden der Untersuchungsgruppe bekannt gewesen. Patienten mit ausschließlich häufiger Allelausprägung ($n=17$) erhielten im Median 5 mg, während Patienten mit einem seltenen Allel ($n=19$) nur 2 mg verabreicht bekamen.

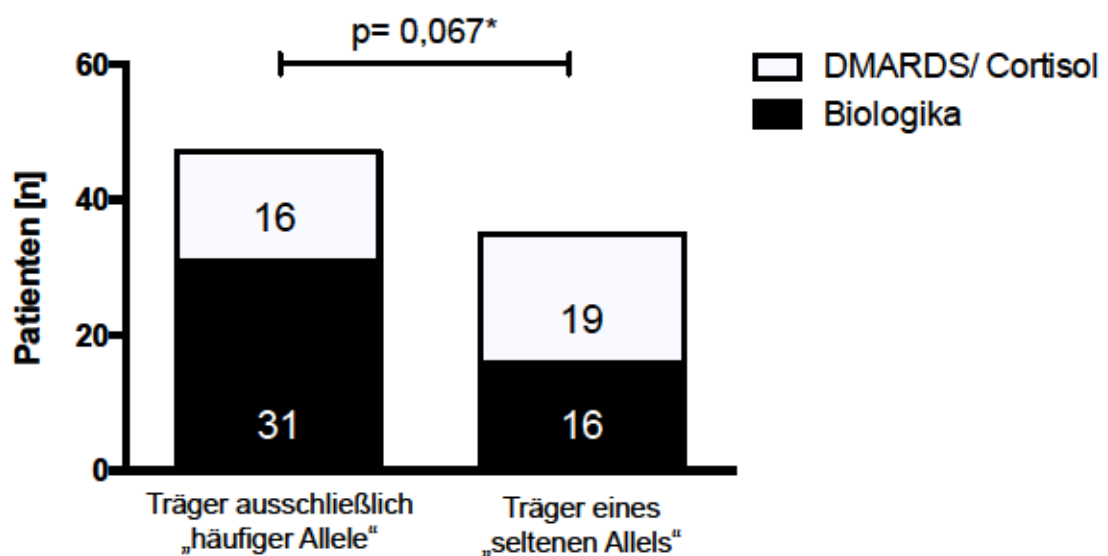


Abbildung 10: Im Trend erhalten Träger eines seltenen Allels auf einem der beiden Loci eher die Basistherapie mit DMARDs und Cortisol. Als Balkendiagramm ist die absolute Verteilung der medikamentösen Therapie zwischen Trägern ausschließlich häufiger ($n= 47$) und eines seltenen Allels ($n= 35$) dargestellt. Innerhalb dieser Gruppen lässt sich die pharmakologische Therapie unterteilen in die Basistherapie mit DMARDs und Cortisol (weiß) oder die erweiterte pharmakologische Maßnahme von Biologika (schwarz). Die Verteilung der Medikamente erreicht im Chi-Quadrat-Test kein signifikant unterschiedliches Niveau ($p\text{-Wert} >0,05$).

Diese Abweichung der Dosis zwischen den Untersuchungsgruppen konnte im Mann-Whitney-U-Test nicht mit einem signifikanten Unterschied belegt werden. Demnach lässt sich festhalten, dass die untersuchten Probanden auch bei Vorliegen des seltenen Allels keine von ihrer Vergleichsgruppe abweichende Steroiddosis erhielten. Zusammenfassend kann für die Therapie der RA angenommen werden, dass Patienten mit vorliegendem, seltenen Allel im TM-Exon oder im Promotor einen Trend zur Basistherapie aufweisen, aber in keinem Fall eine intensivere Therapie erhalten als Träger ausschließlich häufiger Allele.

4.3 Kaum nachweisbarer Serumspiegel von Interleukin 6 bei Trägern eines seltenen Allels

Zur Beurteilung der frühen Entzündungsaktivität im Körper dient IL6 als ein spezifischer Marker. Die unterschiedliche Serumkonzentration des Zytokins in den Untersuchungsgruppen ist in Abbildung 11 dargestellt. Bei Patienten mit ausschließlich häufigen Allelen ($n=14$) wurde eine mediane Serumkonzentration von 16,52 ng/L gemessen.

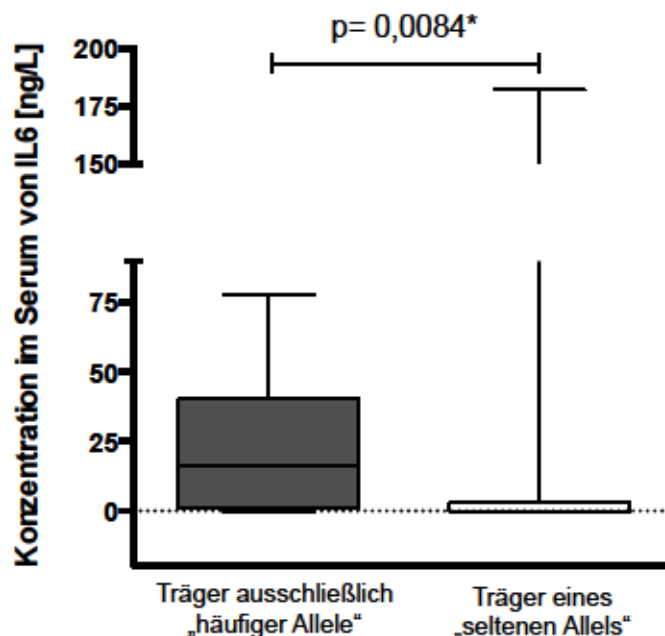


Abbildung 11: Träger eines seltenen Allels zeigen einen geringeren IL6 Serumspiegel. Die Boxplots zeigen eine signifikant niedrigere Serumkonzentration von IL6 bei Vorliegen eines seltenen Allels im TM-Exon und/ oder im Promotor. Die Boxplots zeigen die Verteilung der Quartile inklusive Median sowie das Minimum und das Maximum der Werte. Der Vergleich der IL6 Serumspiegel [ng/L] zwischen Trägern ausschließlich häufiger Allele ($n=14$) und Trägern eines seltenen Allels ($n=17$) weist im Mann-Whitney-Test einen signifikant geringeren Serumspiegel für die Polymorphismusträger auf (p -Wert $< 0,01$).

Tragen Patienten hingegen ein seltenes Allel ($n=17$), konnte nachgewiesen werden, dass der Serumspiegel von IL6 signifikant niedriger ausfiel. Bei der Hälfte der Patienten lag der Serumspiegel unterhalb der Nachweisgrenze (Median = 0,0 ng/L). Nicht in die statistische Berechnung mit eingeflossen sind Proben von Patienten, die mit dem IL6-Antagonisten Tocilizumab behandelt wurden.

Zusammenfassend kann daraus abgeleitet werden, dass Patienten mit rheumatoider Arthritis und gleichzeitiger Ausprägung eines seltenen Allels im TM-Exon und/ oder im Promotor eine signifikant niedrigere Serumkonzentration von IL6 aufweisen als Träger häufiger Allele. Dies lässt vermuten, dass bei Expression eines seltenen Allels eine deutlich niedrigere proinflammatorische Aktivität auftritt. Als Marker für antiinflammatorische Reaktionen wird die Konzentration des Zytokins Interleukin 10 (IL10) bestimmt. Tragen Patienten ausschließlich häufige Allele ($n= 18$), liegt die Serumkonzentration bei einem Median von 0,0 µg/L. Gleiches gilt für Träger einer seltenen Allelvariante ($n= 20$). Der Mann-Whitney-U-Tests weist auf eine signifikant ($p= 0,04$) niedrigere IL10 Konzentration bei Trägern eines seltenen Allels hin. In Summe scheint in dieser Untersuchungsgruppe ein Trend für eine geringere antiinflammatorische Aktivität vorzuherrschen.

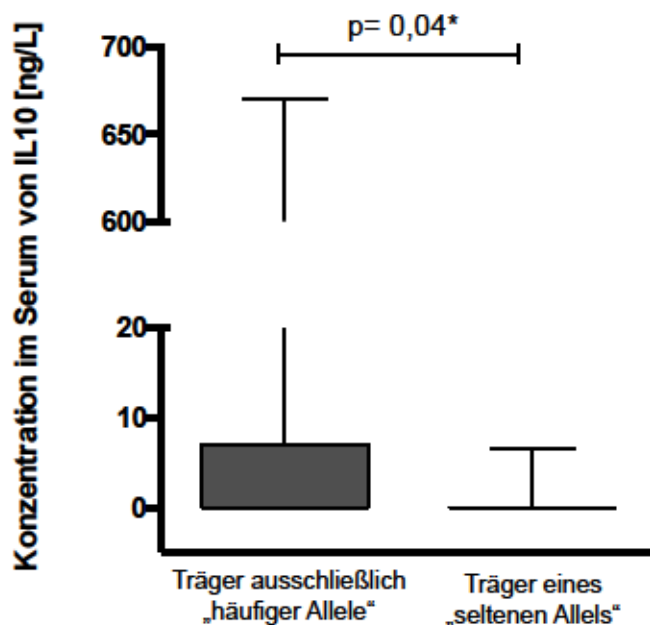


Abbildung 12: Bei Vorliegen eines seltenen Allels in einem Locus fällt die antiinflammatorische Antwort gemessen am IL10 Serumspiegel deutlich geringer aus. Die Boxplots zeigen einen Trend zu stärkerer Antiinflammation durch IL10 bei Trägern ausschließlich häufiger Allele. Die Konzentration von IL10 im Serum ist von Minimum bis Maximum gezeigt. Bei Ausprägung der häufigen Allele auf beiden Loci ($n=18$), verglichen mit Trägern eines seltenen Allels auf mindestens einem der beiden Loci ($n= 20$), weist der Mann-Whitney-U-Test eine statistisch niedrigere Serumkonzentration von IL10 in der Gruppe mit einem seltenen Allel auf.

Die gemeinsame Betrachtung der Zytokinkonzentrationen von IL6 und IL10 verdeutlicht die oben beschriebenen Ergebnisse. Das proinflammatorische Zytokin IL6 kann lediglich bei 40% (n=8) der Träger eines seltenen Allels nachgewiesen werden. Der antiinflammatorische Gegenspieler IL10 liegt in dieser Gruppe bei 5% (n=1) oberhalb der Nachweisgrenze. Eine wiederholte Analyse mit dem exakten Fisher-Test zeigt, dass IL10 signifikant ($p=0,02$) häufig unterhalb der Nachweisgrenze liegt. Für Träger ausschließlich häufiger Allele gilt, dass das proinflammatorische Zytokin IL6 bei 83% (n=15) der Probanden nachweisbar ist. Demgegenüber steht bei 28% (n=5) der Nachweis des antiinflammatorischen Zytokins IL10. Die Analyse mit dem exakten Fisher-Test ergab bei Trägern ausschließlich häufiger Allele einen hoch signifikant ($p=0,002$) häufigeren Nachweis von IL6.

In der Zusammenschau überwiegt die IL6 vermittelte proinflammatorische Immunantwort bei Trägern ausschließlich häufiger Allele signifikant (exakter Fisher-Test: $p=0,009$) im Vergleich zu Probanden mit einem seltenen Allel.

4.4 Ähnliche Konzentrationen des C-reaktiven Proteins in den Untersuchungsgruppen

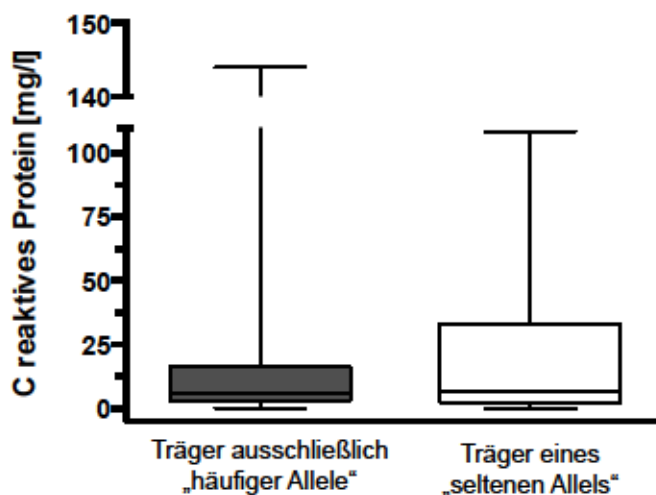


Abbildung 13: Kein Unterschied der Entzündungsaktivität gemessen am CRP-Spiegel. Boxplots zeigen im Median keinen Unterschied im Blutspiegel des CRPs bei RA-Patienten mit ausschließlich häufiger (n=49; grauer Boxplot) und seltener Allelvariante im TM-Exon und/oder Promotor (n=36; weißer Boxplot) des *FcγRIIb*-Gens. Die Boxplots zeigen die Streuung der Messwerte um den Median mit dem oberen und unteren Quartil sowie dem oberen und unteren Extremwert. Die mittlere Linie gibt den Median der Messwerte an. Das Viereck wird durch das obere und untere Quartil begrenzt. Die äußeren Linien spiegeln das Streuungsmaß der Extremwerte des Minimums und Maximums wider.

Das CRP spiegelt die inflammatorische Reaktion im Körper wider. Wie in Abbildung 13 dargestellt, lag das CRP innerhalb der Probandengruppe mit einem seltenen Allel ($n=36$) im Median bei 6,6 mg/l. In der Gruppe mit häufiger Allelausprägung ($n=49$) beträgt der Median 5,95 mg/l. Anhand des Mann-Whitney-U-Tests konnte kein signifikanter Unterschied der CRP-Konzentration zwischen den beiden Untersuchungsgruppen festgestellt werden. Demzufolge kann angenommen werden, dass Träger eines seltenen Allels bezüglich der Entzündungsreaktion, gemessen über das CRP, keine stärkere systemische Entzündungsreaktion im Vergleich zu Trägern ausschließlich häufiger Allele aufweisen.

Bei zusammenfassender Betrachtung der Entzündungsparameter IL6 und CRP kann festgehalten werden, dass die Tendenz eines höheren IL6-Spiegels bei Trägern ausschließlich häufiger Allele sich nicht in der Höhe der CRP-Konzentration widerspiegelt.

4.5 Erstdiagnose erfolgt bei Trägern eines seltenen Allels zu einem späteren Zeitpunkt

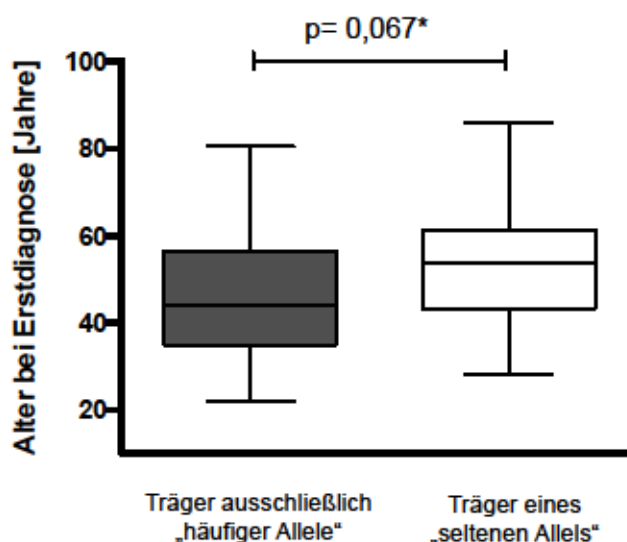


Abbildung 14: Träger eines seltenen Allels weisen auf einen Trend zu späterer Erstdiagnose der RA hin. Die Boxplots zeigen den Median, das obere und untere Quartil sowie die Spannweite zwischen jüngsten und ältesten Patienten. Der Vergleich der Untersuchungsgruppe mit ausschließlich häufigem Allel auf beiden Loci ($n=45$) gegenüber der Gruppe mit einem seltenen Allel auf einem der beiden DNA-Abschnitte ($n=32$) berechnet im Mann-Whitney Test einen p-Wert = 0,067 und liefert somit keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen, sondern zeigt lediglich einen Trend auf. Die mittlere Linie der Boxplots gibt den Median der Messwerte an. Das Viereck wird durch das obere und untere Quartil begrenzt. Die äußeren Linien spiegeln das Streuungsmaß der Extremwerte des Minimums und Maximums wider.

Die Gruppen „Träger ausschließlich häufiger Allele“ und „Träger eines seltenen Allels“ wurden nach dem Gesichtspunkt „Alter bei Erstdiagnose“ analysiert. Wie in Abbildung 14 zu erkennen ist, sind Patienten mit Ausprägung ausschließlich häufiger Allele ($n=45$) bei Erstdiagnose der RA im Median 44 Jahre alt gewesen. Dem gegenüber waren Träger eines seltenen Allels ($n=32$) zum Zeitpunkt der Erstdiagnose im Median 53,9 Jahre alt. Der zeitliche Unterschied von ca. 10 Jahren bei Feststellung der Erstdiagnose zeigte den Trend ($p=0,065$), dass bei Trägern eines seltenen Allels im TM-Exon oder im Promotor die RA später diagnostiziert wurde.

4.6 Keine Unterschiede der Krankheitsaktivität

Der DAS28 ist ein validierter Parameter, welcher bei der RA zur quantitativen Beurteilung der Krankheitsaktivität (siehe auch Kapitel 2.1.3) verwendet wird (Wells et al., 2009). Der DAS28 ist bei $n=44$ der untersuchten Patientenproben erhoben worden. Wie Abbildung 15 veranschaulicht, wiesen Probanden mit Ausprägung ausschließlich häufiger Allele ($n=23$) im Mittel einen DAS28 von 3,7 Punkten auf, während für Träger eines seltenen Allels ($n=21$) der Mittelwert mit einem marginal niedrigeren Score von 2,9 Punkten berechnet wurde.

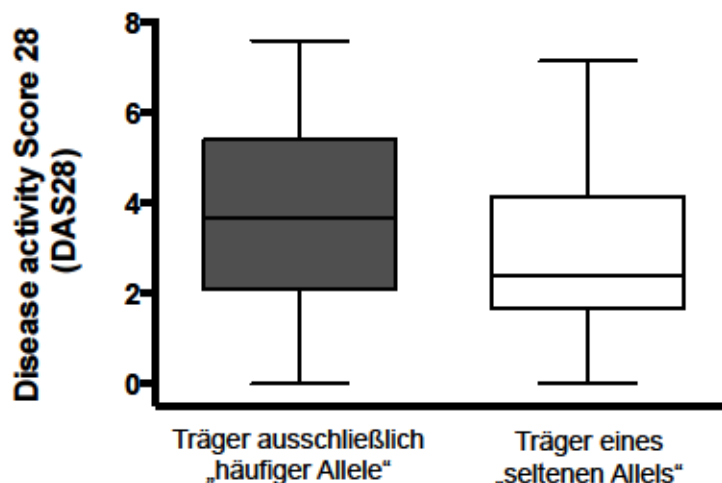


Abbildung 15: Kein schwererer Verlauf bei Trägern eines seltenen Allels gemessen am DAS28. Die Boxplots stellen den Median, das obere und untere Quartil sowie die Spannweite von Minimalwert bis Maximalwert zwischen RA-Patienten mit ausschließlich häufiger ($n=23$) und seltener Allelvariante im TM-Exon und/ oder Promotor ($n=21$) dar. Der t-Test für unabhängige Stichproben weist keinen signifikanten Unterschied auf. Die mittlere Linie der Boxplots gibt den Median der Messwerte an. Das Viereck wird durch das obere und untere Quartil begrenzt. Die äußeren Linien spiegeln das Streuungsmaß der Extremwerte des Minimums und Maximums wider.

Dies bedeutete nach den Referenzwerten (vgl. Kapitel 2.1.3), dass Träger eines seltenen Allels im Mittel eine fehlende oder zumindest niedrige Aktivität der Erkrankung aufwiesen ($<2,6$; $2,7-3,1$). Hingegen war die durchschnittliche Krankheitsaktivität bei Trägern ausschließlich häufiger Allele mittelgradig ($3,1 - 5,2$). Im t-Test für unabhängige Stichproben wichen beide Mittelwerte nicht signifikant voneinander ab. Demnach kann für unsere Kohorte festgehalten werden, dass die Krankheitsaktivität, gemessen am DAS28, durch das Vorliegen einer Allelvariante nicht beeinflusst wird.

Als Marker für die Beurteilung der Knochenresorption ist die Serumkonzentration von CTx bestimmt worden. Der Vergleich zwischen den beiden Untersuchungsgruppen ergab für die CTx-Serumkonzentrationen ebenfalls keinen signifikanten Unterschied (Rohdaten im Anhang). In unserer Kohorte weisen Träger eines seltenen Allels keine verstärkte Knochenresorption auf.

4.7 Höhe der ACPA-Titer variiert nicht zwischen den Kohorten

Die ACPA-Titer zur Beurteilung des Krankheitsverlaufs ab Diagnose sind bei $n=81$ der Probanden bestimmt worden. Diese Antikörpergruppe lässt sich untergliedern in Antikörper gegen citrulliniertes cyclisches Peptid (CCP) und Antikörper gegen mutiertes cyclisches Vimentin (MCV). Die Bestimmung der Autoantikörper der Immunglobulinclassen G1 (IgG1) und G4 (IgG4) erfolgte mittels ELISA und wurde als optische Dichte [OD] gemessen. Die im ELISA gemessene OD entspricht der Höhe der Antikörpertiter der jeweiligen Subklassen. Je höher die OD, desto höher auch die Antikörpertiter. In Abbildung 16 sind Anti-CCP und Anti-MCV mit den Ig-Subklassen für Träger des häufigen Allels im Vergleich zu Trägern eines seltenen Allels dargestellt. Die Autoantikörper gegen CCP der IgG1 lagen bei Trägern eines seltenen Allels ($n=38$) im Median bei einem Titer von $0,99$ [OD]. In der Gruppe mit ausschließlich häufiger Allelausprägung ($n=50$) ist der Antikörpertiter im Median bei $0,96$ [OD] gemessen worden. Die gemessenen Titer von Anti-CCP IgG1 wiesen im Vergleich von Trägern ausschließlich häufiger Allele gegenüber Trägern eines seltenen Allels keinen signifikanten Unterschied auf. Gleiches galt für die gegen CCP gerichteten Immunglobuline der Klasse G4 (IgG4). Für diese Autoantikörper wurde bei Probanden mit einer Allelvariante ($n=38$) im Median ein Titer von $0,19$ [OD] und in der Gruppe mit ausschließlich häufigen Allelen ($n=50$) ein medianer Titer von $0,16$ [OD] gemessen. Die statistische Überprüfung anhand des Mann-Whitney-U-Tests ergab in die-

sem Fall keinen signifikanten Unterschied. Für die CCP-Autoantikörper der Klassen IgG1 und IgG4 kann deshalb angenommen werden, dass die Allelausprägung keinen Einfluss auf die Höhe der Antikörpertiter hat.

Für die Klasse der Autoantikörper, MCV IgG1, wurde bei Trägern eines seltenen Allels (n=38) ein medianer Titer des Anti-MCV IgG1 von 0,14 [OD] gemessen. Unter den Probanden mit ausschließlich häufigen Allelen im TM-Exon und Promotor lag der Titer mit 0,15 [OD] ebenso niedrig. Der Titer für Anti-MCV IgG4 wurde bei Trägern eines seltenen Allels (n=38) mit einem Median 0,06 [OD] und bei Trägern ausschließlich häufiger Allele mit einem Median von 0,07 [OD] berechnet. Die Titer der Autoantikörper MCV IgG1/IgG4 zwischen Trägern ausschließlich häufiger und eines seltenen Allels weisen somit keinen signifikanten Unterschied auf.

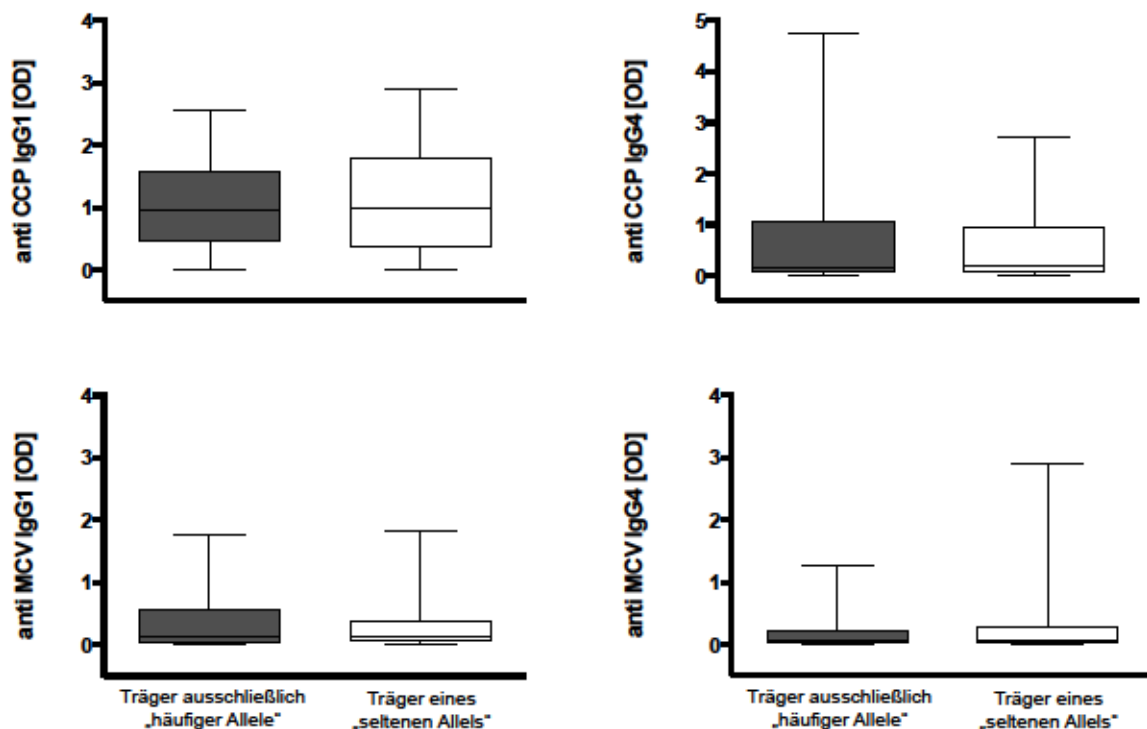


Abbildung 16: Kein Unterschied der einzelnen ACPA-Titer zwischen Trägern ausschließlich „häufiger Allele“ und eines „seltenen Allels“. In der oberen Reihe sind die Anti-CCP-Titer abgebildet für Träger ausschließlich häufiger Allele (dunkel) und Träger eines seltenen Allels (hell). Oben links ist die Verteilung der Anti-CCP IgG1 Titer gezeigt und oben rechts die Verteilung der CCP IgG4 Titer. In der unteren Reihe ist der Vergleich der Anti-MCV-Titer zwischen den beiden Untersuchungsgruppen zu finden. Links ist die Verteilung der Anti-MCV IgG1 Titer und rechts Anti-MCV IgG4 Titer abgebildet. Die statistische Berechnung der einzelnen ACPA-Titer ergibt keinen signifikanten Unterschied im Mann-Whitney-U-Test. Die mittlere Linie der Boxplots gibt den Median der Messwerte an. Das Viereck der Boxplots wird durch den Median unterteilt und durch das obere und untere Quartil begrenzt. Die äußeren Linien spiegeln das Streuungsmaß der Extremwerte mit Minimum und Maximum wider.

Zusammenfassend liefert die Analyse der gängigsten ACPA-Subklassen zwischen Trägern ausschließlich häufiger Allele und Trägern eines seltenen Allels keine statistisch signifikanten Unterschiede. Für unsere Kohorte kann demnach festgehalten werden, dass das alleinige Vorliegen eines Polymorphismus im *FCGR2b*-Gen keine höheren ACPA-Titer zur Folge hat.

4.8 Differenzierte Lymphozytenaktivierung bei RA-Patienten in Abhängigkeit der Allelausprägung im Promotor oder TM-Exon

4.8.1 Geringere CTLA-4 Expression auf T-Lymphozyten bei Trägern eines seltenen Allels

Populationen von T-Lymphozyten lassen sich anhand ihrer Oberflächenantigene differenzieren. In dieser Arbeit wurde die Expression des CTLA-4 auf konventionellen T-Lymphozyten untersucht (vergleiche Abbildung 17). Die Expression von CTLA-4 wurde als mittlere Fluoreszenz Intensität (MFI) gemessen und betrug bei Trägern ausschließlich häufiger Allele (n=17) im Median 104 [MFI]. In der Probandengruppe der Träger eines seltenen Allels (n= 16) wurde CTLA-4 weniger stark exprimiert.

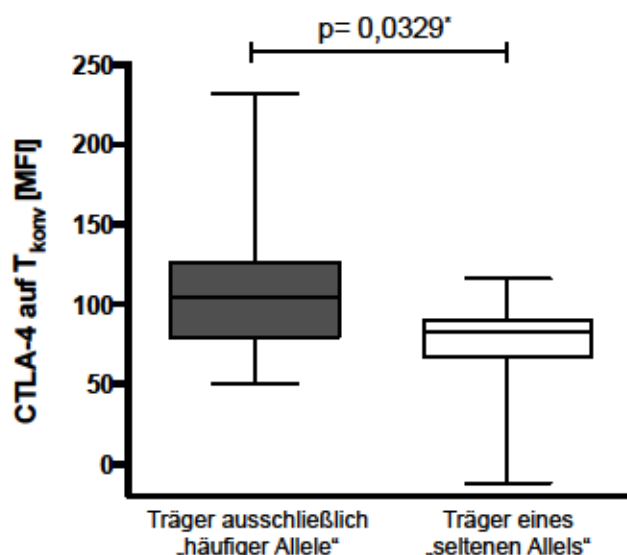


Abbildung 17: Geringere Expressionsstärke von CTLA-4 bei Trägern eines seltenen Allels. Der Vergleich von Trägern der häufigen Allele (n=17) und Trägern eines seltenen Allels (n= 16) weist im Mann-Whitney-Test eine signifikant geringere Expression von CTLA-4 bei Trägern eines seltenen Allels auf (p-Wert <0,05). Die Boxplots stellen den Median, das obere und untere Quartil sowie die Spannweite von minimaler MFI bis maximale MFI dar. Die mittlere Linie der Boxplots gibt den Median der Messwerte an. Das Viereck wird durch das obere und untere Quartil begrenzt. Die äußeren Linien spiegeln das Streuungsmaß der Extremwerte zwischen Minimum und Maximum wider.

Der Median lag in dieser Gruppe bei 83 [MFI]. Die MFI von CTLA-4 auf konventionellen T-Lymphozyten war bei Probanden mit einem seltenen Allel signifikant (p -Wert= 0,03) niedriger als in der Vergleichsgruppe, den Trägern ausschließlich häufiger Allele.

In den folgenden Darstellungen der Ergebnisse werden die Träger eines seltenen Allels nach der Lokalisation im TM-Exon oder Promotor differenziert betrachtet. Die Expression von CTLA-4 auf natürlichen regulatorischen T-Lymphozyten (CD 127⁺ Helios⁺ FOXP3⁺) ist in Abbildung 18 veranschaulicht. Der gemessene Median für die Expression von CTLA-4 auf regulatorischen T-Lymphozyten lag bei Trägern des seltenen Allels im TM-Exon ($n= 5$) mit 634 [MFI] deutlich niedriger als in der Gruppe der Träger des seltenen Allels im Promotor ($n= 8$). Bei Vorliegen des seltenen Allels im Promotor lag der Median bei 1411 [MFI]. Die Expression von CTLA-4 auf regulatorischen T-Lymphozyten unterschied sich somit signifikant zwischen den Trägern des seltenen Allels im TM-Exon und Trägern des seltenen Allels im Promotor ($p < 0,05$). In der Gruppe der Träger mit ausschließlich häufigen Allelen ($n= 17$) wurde im Median eine CTLA-4 Expression von 845 [MFI] gemessen. Der Vergleich von Trägern ausschließlich häufiger Allele mit Trägern des seltenen Allels im TM-Exon ergibt anhand des Mann-Whitney-U-Tests einen hoch signifikanten Unterschied (p -Wert $< 0,01$) zwischen den Gruppen.

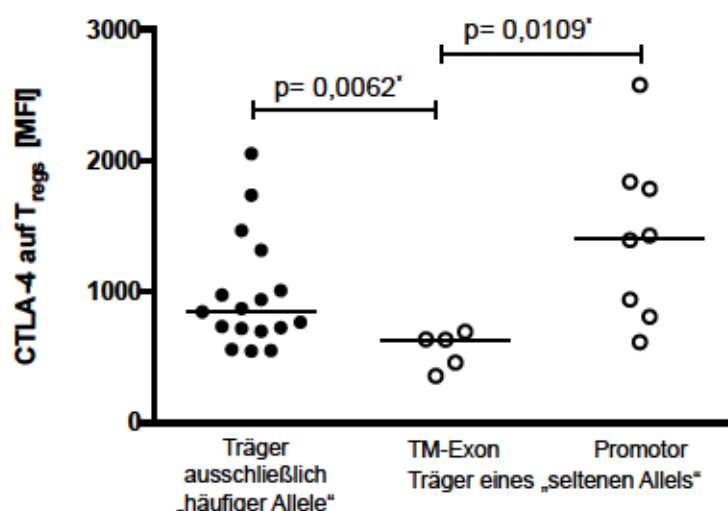


Abbildung 18: CTLA-4 wird bei Trägern eines seltenen Allels im TM-Exon signifikant niedriger exprimiert als in den Vergleichsgruppen. Das Punktediagramm bildet die Anzahl der Patienten mit ausschließlich häufigen Allelen (links; schwarz) ($n=17$) und seltenem Allel im TM-Exon (mittig; weiß) ($n=5$) sowie im Promotor (rechts; weiß) ($n=8$) ab und zeigt die jeweilige Expressionsstärke von CTLA-4 auf natürlichen regulatorischen T-Lymphozyten gemessen in MFI. Die Einzelmesswerte (Punkte) streuen um den Median (Linie). Die p -Werte wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test berechnet.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Expression von CTLA-4 mit dem Vorliegen eines seltenen Allels korreliert. Die Korrelation zwischen Allelvariante und CTLA-4 Expression variiert zwischen konventionellen und regulatorischen T-Lymphozyten. Auf konventionellen T-Lymphozyten korrelierte das Vorliegen eines Polymorphismus mit einer verminderten Expression von CTLA-4. Hingegen korrelierte auf regulatorischen T-Lymphozyten die signifikant geringste Expression von CTLA-4 mit Vorliegen des Transmembranpolymorphismus. Träger des Promotorpolymorphismus wiesen eine Korrelation mit einer vermehrten CTLA-4 Expression auf regulatorischen T-Lymphozyten auf. Die geringe Expression von CTLA-4 kann nach physiologischen Kenntnissen in einer fehlenden Hemmung der Effektorzellen resultieren (vergleiche Kapitel 2.1.2).

4.8.2 Veränderte Expression der kostimulatorischen Oberflächenantigene CD80/CD86 auf B-Lymphozyten bei Trägern des seltenen Allels

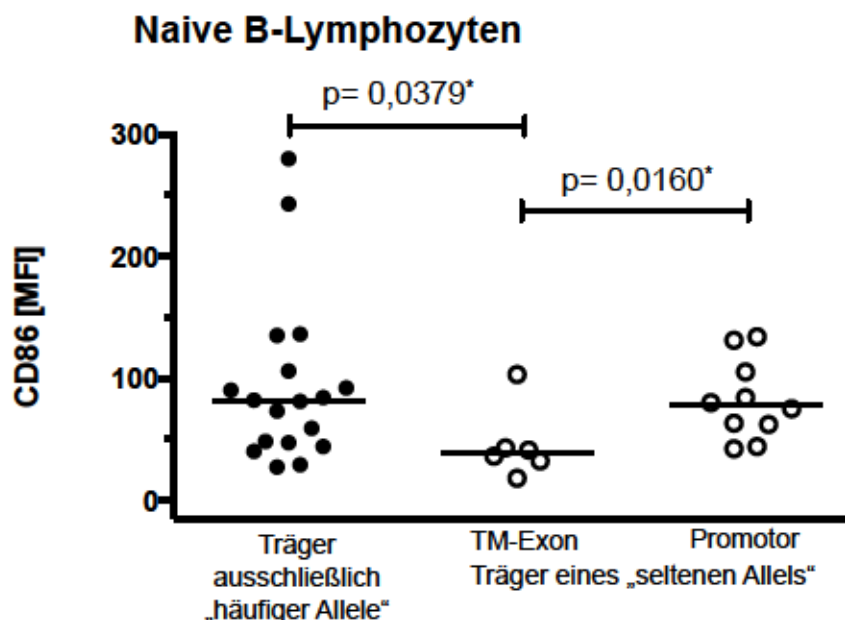


Abbildung 19: Die Expression von CD86 auf naiven B-Zellen ist bei Trägern eines seltenen Allels im TM-Exon am niedrigsten. Das Punktediagramm bildet die Anzahl der Patienten mit ausschließlich häufigen Allelen (links; schwarz) und einem seltenen Allel im TM-Exon (mittig; weiß) oder im Promotor (rechts; weiß) ab. Die signifikant geringste Expressionsfrequenz für CD86 zeigte sich im Mann-Whitney-Test bei Vorliegen eines seltenen Allels im TM-Exon. Die Einzelmesswerte (Punkte) streuen um den Median (Linie).

Im Folgenden wurde die Expression von kostimulatorischen Molekülen (CD80/CD86) auf Populationen der B-Lymphozyten untersucht. Beide Oberflächenproteine wurden unter Berücksichtigung der Expression auf naiven B-Lymphozyten und B-Gedächtnis-Zellen analysiert. Auf diesen beiden Klassen der B-Lymphozyten korreliert die Expression von CD86 unterschiedliche mit dem jeweiligen Polymorphismus im *FCGR2b*-Gen (vergleiche Abbildung 19 und Abbildung 20).

Auf naiven B-Lymphozyten wurde die Expression von CD86 bei Trägern ausschließlich häufiger Allele ($n=18$) mit einer mittleren Intensität von 81,5 [MFI] gemessen. Für Träger des seltenen Allels im TM-Exon ($n=6$) lag die gemessene Intensität mit einem Median von 38,5 [MFI] deutlich niedriger. In der Gruppe mit seltenem Allel im Promotor ($n=10$) wiesen Probanden für die CD86 Expression im Median eine MFI von 77,5 [MFI] auf.

Auf B-Gedächtniszellen korreliert die Expression von CD86 am stärksten mit der seltenen Allelvariante im TM-Exon. In der Gruppe der Träger des seltenen Allels im TM-Exon ($n=6$) lag die MFI mit einem Median von 47 [MFI] signifikant unter den medianen Messwerten der Träger des seltenen Allels im Promotor (95,5 [MFI]; $n=10$; p -Wert = 0,031) sowie den Trägern ausschließlich häufiger Allele (85 [MFI]; $n=18$; p -Wert = 0,0030) (vergleiche Abbildung 20).

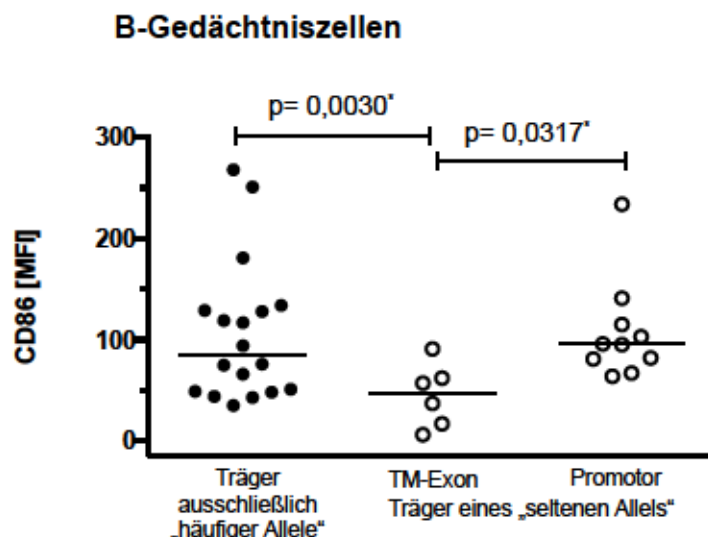


Abbildung 20: Die Expression von CD86 auf B-Gedächtniszellen ist bei seltenem Allel im TM-Exon am niedrigsten. Der Graph bildet im Punktediagramm die Anzahl der Patienten mit ausschließlich häufigen Allelen (links; schwarz) und seltenem Allel im TM-Exon (mittig; weiß) oder im Promotor (rechts, weiß) ab. Die statistische Analyse zeigte im Mann-Whitney-U-Test die geringste Expressionsfrequenz von CD86 beim Vorliegen eines seltenen Allels im TM-Exon. Die Einzelmesswerte (Punkte) streuen um den Median (Linie).

Für beide Klassen der B-Lymphozyten gilt: der Median für die Fluoreszenzintensität von CD86 nahm in der Untersuchung bei Trägern des seltenen Allels im Promotor und Trägern ausschließlich häufiger Allele annähernd gleiche Werte an, ohne signifikante Differenz. Der Vergleich der einzelnen Gruppen untereinander mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests verdeutlichte, dass bei Trägern des seltenen Allels im TM-Exon die Expression von CD86 auf naiven B-Lymphozyten ($p\text{-Wert} = 0,0379$; vergleiche Abbildung 19) und B-Gedächtniszellen ($p\text{-Wert} = 0,0317$; vergleiche Abbildung 20) signifikant niedriger als in den beiden anderen Gruppen ausfiel.

Auf B-Gedächtnis-Zellen wurde ergänzend das kostimulatorische Molekül CD80 untersucht (vergleiche Abbildung 21). Die Expression dieses Oberflächenproteins korrelierte, im Gegensatz zu CD86, nicht signifikant mit der Ausprägung des seltenen Allels im TM-Exon des *FCGR2b*-Gens. Hingegen zeigten Träger des seltenen Allels im Promotor (171,7 [MFI]) im Vergleich zu Trägern ausschließlich häufiger Allele (114 [MFI]) eine signifikant erhöhte Expressionsstärke ($p\text{-Wert} = 0,0170$) von CD80 auf B-Gedächtniszellen. Der Vergleich beider Gruppen mit Trägern des seltenen Allels im TM-Exon (125 [MFI]) wies auf keinen signifikanten Unterschied der Expressionsstärke von CD80 hin.

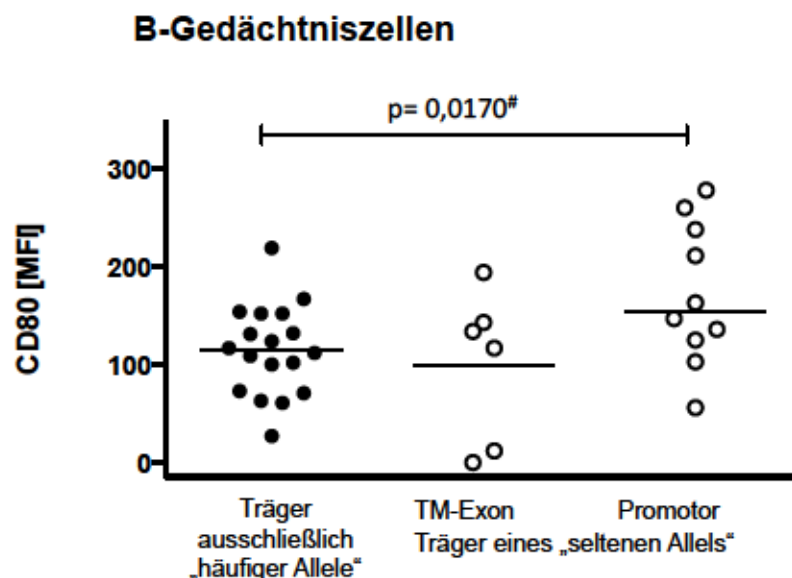


Abbildung 21: Träger eines Promotorpolymorphismus exprimieren deutlich mehr CD80 auf B-Gedächtniszellen. Das Punktediagramm bildet die Expression von CD80 auf B-Gedächtnis-Zellen ab. Die Punktediagramme stellen jeweils die Anzahl der Patienten mit ausschließlich häufigem Allel (links; schwarz) ($n=18$) und seltenem Allel im TM-Exon (mittig; weiß) ($n=6$) oder im Promotor (rechts; weiß) ($n=10$) dar. Die Einzelmesswerte (Punkte) streuen um den Mittelwert (Linie). Die p -Werte sind mit Hilfe des t -Tests berechnet worden.

Somit kann konstatiert werden, dass abhängig vom Vorliegen des TM- oder Promotorpolymorphismus die Expression der kostimulatorischen Moleküle CD86 und CD80 variiert. Die veränderte Expression der Oberflächenmoleküle spielt eine essenzielle Rolle bei der Interaktion von B- und T-Lymphozyten (vergleiche Kapitel 2.1.2). Für beide Polymorphismen kann vermutet werden, dass die veränderte Expression der kostimulatorischen Moleküle auf B-Lymphozyten die suppressive Funktion der regulatorischen T-Lymphozyten unterstützt (Manzotti et al., 2002; Zheng et al., 2004). Dennoch kann aufgrund der Expression von CD86 eine Aktivierung autoreaktiver T-Lymphozyten, somit auch der Autoimmunreaktion, nicht vollständig vermieden werden (O'Neill et al., 2007).

5 Diskussion

Die eingangs gestellte Hypothese, Polymorphismen im *FCGR2b*-Gen sind mit einem negativen Verlauf der klinischen Symptomatik der RA assoziiert, konnte für die untersuchte Kohorte nicht bestätigt werden. Hypothese zwei, Träger der Allelvariante können klinisch und laborchemisch von Wildtyp-Trägern (häufiges Allel) unterschieden werden, konnte nicht bestätigt werden. Die erhobenen Daten liefern viel mehr einen Anhalt dafür, dass das Vorliegen der Allelvariante im TM-Exon oder Promotor mit einem späteren Krankheitsbeginn und einem milderen Verlauf des klinischen Erscheinungsbildes der RA assoziiert sind. Die dritte Hypothese, die Expression von Oberflächenproteinen auf Lymphozyten variere in Abhängigkeit des jeweiligen Polymorphismus, konnte anhand der Untersuchungsergebnisse belegt werden.

Die vorliegende Arbeit beleuchtet als erste die Auswirkungen der *FCGR2b* Polymorphismen im Promotor und im TM-Exon auf Aspekte des klinischen Bildes der RA.

Die Anwesenheit der Polymorphismen bei RA Patienten weist auf andere Korrelationen als beim SLE hin

Wie zu Beginn der Arbeit beschrieben, wurden sowohl der TM- als auch der Promotorpolymorphismus bislang primär im Zusammenhang mit dem Krankheitsbild des SLE untersucht. In den vergangenen Jahren wurde gezeigt, dass Träger eines seltenen Allels im Promotor oder TM-Exon aus bestimmten Bevölkerungsgruppen, vornehmlich Asiaten oder Afro-Amerikaner, gehäuft an einem SLE erkranken (Blank et al., 2005; Clatworthy et al., 2007; Willcocks et al., 2010). Eine Arbeit mit schwedischer Kohorte konnte dies für ihre Einwohner jedoch nicht bestätigen (Magnusson et al., 2004). Dies zeigt, wie heterogen die Auswirkungen der Polymorphismen in Abhängigkeit von der Bevölkerungsgruppe sein können. Die Arbeit von Waisberg et. al weist darauf hin, dass phänotypische Erscheinungen der Allelvarianten abhängig von den einflussnehmenden Umweltfaktoren sind. Wird das Immunsystem permanent mit parasitären Infektionserkrankungen konfrontiert, haben Träger des TM-Polymorphismus einen Vorteil gegenüber den Infektionserkrankungen. Fehlt dieser Umwelteinfluss, erkranken die Träger des seltenen Allels im TM-Exon gehäuft am SLE. Dies konsolidiert, wie multifaktoriell die Pathogenese systemischer Autoimmunerkrankungen ist (Waisberg et al., 2011). Wie ausschlaggebend Umweltfaktoren für

die Pathogenese sind, haben Kawano et. al im Mausmodell demonstriert. Sie haben gezeigt, dass additive epistatische Faktoren bei FcγRIIb-defizienten Mäusen zu einer Konversion der RA in einen SLE führen können (Kawano et al., 2013). Demnach bilden die ethnische Herkunft inklusive der genetischen Ausstattung, des individuellen Lebensstils und die vom Lebensstandort abhängigen Umwelteinflüsse sich addierende Faktoren, die mit der Krankheitsentstehung der beiden Autoimmunerkrankungen assoziiert sind (Jawaheer et al., 2001; Klareskog et al., 2010). Die herausgearbeiteten Ähnlichkeiten der Pathogenese von SLE und RA können auch für die Assoziation mit den Polymorphismen im *FCGR2b* angenommen werden. Im Vergleich zu den Kohorten in anderen Publikationen, wies die in dieser Arbeit untersuchte Stichprobe von RA-Patienten eine ähnliche Verteilung der Allelhäufigkeiten auf, wie die der europäischen Normalbevölkerung (U.S. National Library of Medicine, 2014a, 2014b). Somit bestand bei RA-Patienten unserer Kohorte keine Assoziation zu einem vermehrten Vorkommen der seltenen Allele im *FCGR2b* Gen, im Gegensatz zu den beschriebenen Untersuchungen von SLE Patienten (Blank et al., 2005). Dies lässt vermuten, dass trotz vieler Ähnlichkeiten der beiden systemischen Autoimmunerkrankungen die Polymorphismen im *FCGR2b* unterschiedliche Assoziationen zu den krankheitsspezifischen Merkmalen aufweisen. Welche Korrelation zwischen dem Vorliegen eines der seltenen Allele im *FCGR2b* und der RA besteht, wird im Folgenden diskutiert.

Die Ausprägung einer Allelvariante korreliert mit einem niedrigen proinflammatorischen IL6-Spiegel

Die Charakterisierung der klinisch messbaren Entzündung wurde anhand von laborchemischen Parametern durchgeführt. Srirangan und Choy schreiben dem proinflammatorischen Zytokin IL6 eine zentrale Rolle in der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis zu (Srirangan und Choy, 2010). In der beschriebenen Kohorte wiesen Patienten mit Allelvariante einen sehr niedrigen IL6 Serumspiegel auf. Da aus der Literatur bekannt ist, dass bestimmte Medikamente zur Behandlung der RA den IL6 Spiegel beeinflussen, wurden Probanden, welche den IL6-Inhibitor Tocilizumab erhalten haben, aus statistischen Berechnungen von IL6-Serumspiegeln ausgeschlossen (Brizzolara et al., 2011; Fiocco et al., 2008; Nishimoto et al., 2008).

Als weiteren Effekt induziert IL6 die Entwicklung systemischer Symptome. Ebenso spielt es eine Rolle bei der Ausprägung der Gelenkbeteiligung sowie bei der Beein-

flussung der humoralen Immunantwort. Niedrige Serumspiegel des Zytokins IL6, wie sie hier bei Trägern der Allelvariante gemessen wurden, gelten als positive Prädiktoren für den Krankheitsverlauf der RA und sprechen für ein besseres funktionelles Ergebnis (Kojima et al., 2013; Shimamoto et al., 2013).

Die in dieser Arbeit ausgewerteten Parameter zur Schwere der RA sind in ähnlicher Weise auch in anderen Untersuchungen begutachtet worden. So haben Radstake et al. die IL6 Produktion von DC *in vitro* bei RA-Patienten mit seltenem Allel im TM-Exon untersucht. Die Arbeitsgruppe hat Patienten in der aktiven Krankheitsphase Blut abgenommen, daraus DC kultiviert und im Überstand der Kultur die Konzentration verschiedener Zytokine gemessen. Die Stimulation der DC erfolgte mittels Lipopolysaccharid und Immunkomplexen. Bei Probanden im aktiven Krankheitsschub mit einem DAS28 > 5,2 und einer Basistherapie mit MTX, die gleichsam Träger der seltenen Allelvariante im TM-Exon waren, wurde eine gesteigerte IL6 und IL10 Produktion beobachtet (Radstake et al., 2006). Die in dieser Arbeit beobachteten, kaum nachweisbaren Serumspiegel von IL6 bei Trägern eines seltenen Allels stehen im Gegensatz zu den *in vitro* erhobenen Ergebnisse von Radstake et al. In diesem Zusammenhang ist zu berücksichtigen, dass sich die in der hier vorliegenden Untersuchung erhobenen Ergebnisse auf gut therapierte RA-Patienten beziehen, welche sich nicht zwingend in einer akuten Krankheitsphase befanden. Zudem wurden Probanden, die mit einem IL6 interagierenden Medikament behandelt wurden, ausgeschlossen. Des Weiteren wurden die Daten in der vorliegenden Arbeit retrospektiv erhoben und berücksichtigen neben der Allelvariante im TM-Exon auch die Ausprägung des seltenen Allels im Promotor. Hingegen haben Radstake et al. eine prospektive Fall-Kontroll-Studie durchgeführt, die lediglich eine Aussage zur Allelvariante im TM-Exon trifft (Radstake et al., 2006). Trotz aller Unterschiede weist die vorliegende Datenerhebung daraufhin, dass Träger der Allelvariante im therapierten Stadium nicht von einer stärkeren Entzündungsaktivität - gemessen am IL6 Serumspiegel - betroffen sind.

Keine Korrelation zwischen der Anwesenheit einer Allelvariante und charakteristischen, klinisch-laborchemischen Parametern der RA nachweisbar

Das Zytokin IL6 induziert die Bildung von Akut-Phase-Proteinen in der Leber. Eines dieser Akut-Phase-Proteine ist das CRP (Castell et al., 1989). Amos et al. haben gezeigt, dass die Gelenkdestruktion bei RA-Patienten mit einem erhöhten CRP-Spiegel

korreliert (Amos et al., 1977). In der vorliegenden Untersuchung ist bei RA-Patienten der CRP-Spiegel in Abhängigkeit der Allelvarianten im *FCGR2b* untersucht worden. Eindeutig wiesen Träger eines seltenen Allels keine stärkeren Entzündungsparameter auf als die Kontrollgruppe. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Intensität der Inflammation - gemessen am CRP-Spiegel - unabhängig vom Vorliegen des häufigen oder seltenen Allels im Promotor oder TM-Exon ausfällt. Eine vergleichende Studie, die den CRP-Spiegel in Abhängigkeit der Allelvarianten im *FCGR2b* untersucht hat, liegt derzeit nicht vor.

Die charakteristischen pathologischen Aspekte der RA wurden einerseits mit Hilfe des Krankheitsaktivitätsindex DAS28 und andererseits durch die Bestimmung der ACPA-Titer analysiert. Für beide Parameter konnte zwischen Trägern der Allelvariante und Trägern ausschließlich häufiger Allele kein Unterschied nachgewiesen werden. Zur Interpretation des DAS28 ist anzumerken, dass dieser standardisierte Index durch qualifiziertes Personal der rheumatologischen Sprechstunde im Südstadtklinikums Rostock erhoben wurde. Die klare Definition des DAS28 ermöglichte eine valide Datenerfassung (Fransen et al., 2004; Wells et al., 2009).

Die ACPA-Titer gelten als spezifische Laborparameter mit prädiktiver Aussagekraft zum Krankheitsverlauf der RA (Niewold et al., 2007; Vossenaar et al., 2004). Die untersuchte Kohorte wurde bewusst aus ACPA positiven RA-Patienten generiert, da diese Patientengruppe eine einheitliche Pathophysiologie bietet und signifikante Unterschiede zu ACPA negativen Probanden aufweist (Padyukov et al., 2010). Die Antikörperproduktion wird durch IL6 über die B-Lymphozyten sowie über die Interaktion von B- und T-Lymphozyten getriggert (Carreno und Collins, 2002; Srirangan und Choy, 2010). Der Vergleich beider Untersuchungsgruppen lieferte keinen Hinweis auf signifikante Unterschiede der ACPA-Titer. Allerdings fiel auf, dass unter den ACPA positiven RA-Patienten nur 21% Träger des seltenen Allels im TM-Exon waren. Dies bestätigt die von Chen et al. publizierten Daten, dass ACPA positive RA-Patienten eher das häufige Allel im TM-Exon tragen (Chen et al., 2008). Die Übereinstimmung der Allelhäufigkeiten zwischen zwei ethnisch und genetisch unabhängigen Populationen erhärtet somit den Verdacht, dass das Vorliegen des seltenen Allels in keinem Zusammenhang mit der Entstehung einer ACPA positiven RA steht. Die Bestimmung der spezifischen ACPA Titer (Anti-CCP Antikörper und Anti-MCV Antikörper) dient diagnostischen und prognostischen Zwecken. Aus der Literatur ist bekannt, dass ACPA positive RA-Patienten einen aggressiveren Verlauf der Erkrankung erleben als

ACPA negative Patienten (Innala et al., 2008; Mathsson et al., 2008). Die hier erhobenen Daten legen nahe, dass bei ACPA positiven RA-Patienten durch Vorliegen eines Polymorphismus im *FCGR2b*-Gen ein gravierenderer Krankheitsverlauf - gemessen am ACPA Status der Patienten - ausbleibt.

Das Vorliegen einer Allelvariante korreliert mit einem höheren Lebensalter bei Erstmanifestation

Patienten mit der Allelvariante wiesen einen Trend zu späterer Erstmanifestation der RA auf. Bei späterer Erstmanifestation kann davon ausgegangen werden, dass eine kürzere Krankheitsdauer erlebt wird. Wie bereits in vergangenen Untersuchungen festgestellt wurde, beeinflusst die Krankheitsdauer sowohl die Schwere des Krankheitsverlaufs als auch das Auftreten von Komorbiditäten (Healey, 1986; Huscher et al., 2013). Der verzögerte Krankheitsbeginn der RA bei Trägern eines seltenen Allels lässt die Vermutung zu, dass Probanden mit Allelvariante weniger gravierend von der Erkrankung beeinträchtigt sein können.

Der Trägerstatus eines seltenen Allels korreliert mit einer gehäuften Anwendung der Basistherapie

Wie in Kapitel 2.1.4 erwähnt, besteht die pharmakologische Basistherapie aus einer Kombination von Cortisol und DMARDs. Erst wenn die Kombination von klassischen DMARDs nicht zur gewünschten Remission führt, wird empfohlen die Patienten auf Biologika umzustellen (Deutsche Gesellschaft für Rheumatologie, 2012). In der vorliegenden Stichprobe erhielten Patienten mit Allelvariante anteilig am häufigsten die gleichzeitige Gabe von Cortisol und DMARDs. Probanden mit ausschließlich häufigen Allelen benötigten hingegen eher eine komplexe medikamentöse Therapie mit Biologika. Die Umstellung auf Biologika wird in den Leitlinien bei andauernder Aktivität der RA unter Basistherapie empfohlen (Deutsche Gesellschaft für Rheumatologie, 2012; van de Putte, 2004). Im Rahmen der vorliegenden Datenerhebung ist eine leitlinienkonforme Therapie angenommen worden. Die Patienten wurden regelmäßig in einer Spezialsprechstunde betreut, so dass von einer individuell erfolgreichen Therapie gemäß medizinischer Standards ausgegangen werden kann, obwohl eine Publikation für Nordamerika auf eine Unterversorgung in der medikamentösen Therapie von älteren RA-Patienten hinweist (Tutuncu et al., 2006). Die medikamentöse Versorgungssituation in Deutschland ist aktuell allerdings unklar. Die erfolgreiche Be-

handlung der RA-Patienten mit einem seltenen Allel unter Einnahme der Basismedikation kann auf ein verbessertes Ansprechen zurückzuführen sein. Alternativ kann unter der Annahme einer leitlinienkonformen, individuell erfolgreichen, Therapie ein indirekter Rückschluss auf den Krankheitsverlauf gezogen werden. Das erfolgreiche Ansprechen auf die Basistherapie lässt für diesen Fall einen milderen Krankheitsverlauf der RA vermuten. Dabei ist kritisch zu erwähnen, dass bei der Erhebung der pharmakologischen Therapie kein Verlauf dokumentiert wurde. Die Auswertung erfolgte auf Basis der therapeutischen Versorgung zu einem bestimmten Zeitpunkt. Deshalb konnte nicht differenziert betrachtet werden, welchen Effekt unerwünschte Nebenwirkungen auf die Therapieauswahl genommen haben oder ob die Patienten im weiteren Verlauf eine Therapieumstellung benötigten.

Das Vorliegen einer Allelvariante ist nicht mit einer vermehrten Knochenresorption assoziiert

In der Vergangenheit durchgeführte Untersuchungen zum Transmembranpolymorphismus bei RA-Patienten postulierten eine gesteigerte Gelenkdestruktion, die radiologisch nachweisbar war (Radstake et al., 2006). Bei den hier untersuchten Probanden wurde die Gelenkdestruktion nicht isoliert betrachtet, sondern lediglich die Momentaufnahme der Knochenresorption anhand der Bestimmung von CTx im Serum. Aus der Messung der CTx-Konzentration konnte für Probanden mit einem seltenen Allel kein Hinweis auf einen schwereren Verlauf der RA verzeichnet werden (Rohdaten im Anhang), da kein signifikanter Unterschied zwischen Trägern eines seltenen Allels und Trägern ausschließlich häufiger Allele nachweisbar war. Die von Radstake et al. beschriebene stärkere Gelenkdestruktion bei RA-Patienten mit TM-Polymorphismus konnte durch die vorliegenden Ergebnisse nicht bestätigt werden (Radstake et al., 2006).

Die Oberflächenexpression von kostimulatorischen Molekülen auf B-Lymphozyten korreliert unterschiedlich mit der Anwesenheit des Transmembran- und Promotorpolymorphismus bei RA-Patienten

Eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie der RA spielt die Homöostase der B- und T-Lymphozyten. Daran sind im Wesentlichen kostimulatorische Signalwege beteiligt, die über CD80/86 und CTLA-4/CD28 reguliert werden (vergleiche Kapitel 2.1.2.) (Chu et al., 2014; Jain et al., 2010). Mit Ausnahme von CD28 ist die Expression die-

ser Moleküle erfasst worden. Die beiden Oberflächenmoleküle CD80 und CD86 rufen bei der Interaktion mit CTLA-4 gegensätzliche Wirkungen hervor (Manzotti et al., 2002; Zheng et al., 2004). Auf B-Lymphozyten wurde die Expression von CD80 und CD86 gemessen. Das Vorliegen des Promotorpolymorphismus korrelierte mit einer verstärkten Expression von CD80 auf B-Lymphozyten. CD80 stellt den dominanten Bindungspartner von CTLA-4 dar und ruft eine effektive Suppression der nachgeschalteten Immunantwort durch regulatorische T-Lymphozyten hervor (Zheng et al., 2004).

Bei Trägern des TM-Polymorphismus besteht hingegen eine signifikante Korrelation zu einer verminderten Expression von CD86. Die Interaktion von CTLA-4 mit CD86 führt zu einer Hemmung der suppressiven Funktion regulatorischer T-Lymphozyten. Ist das Molekül an der Oberfläche sehr stark exprimiert, sind die Zellen sogar resistent gegenüber der Suppression von regulatorischen T-Lymphozyten (Zheng et al., 2004). Eine verminderte Expression von CD86 auf B-Lymphozyten, wie sie hier vorliegt, kann demnach mit einer verbesserten Selektion autoreaktiver Zellen assoziiert sein. Dies könnte bedingt sein durch eine ungehinderte Interaktion von CD80 und CTLA-4 (Manzotti et al., 2002; Zheng et al., 2004).

Der Transmembranpolymorphismus korreliert mit einer verminderten Aktivität der B-Lymphozyten

Die festgestellte verminderte Expression von CD86 auf naiven und Gedächtnis-B-Lymphozyten weist auf einen verminderten Aktivierungsgrad dieser Zellpopulation hin (O'Neill et al., 2007). Die Bedeutung der Expression von CD86 auf B-Lymphozyten wurde von O'Neill und Kollegen untersucht. Sie beschrieben, dass die fehlende Expression von CD80/86 auf B-Lymphozyten im Mausmodell den Ausbruch der RA verhindert (O'Neill et al., 2007). Die Korrelation des TM-Polymorphismus mit einer verminderten Expression von CD86 könnte demnach mit einem verminderten Ausbruch der RA assoziiert sein. Das Mausmodell von O'Neill et al. zeigte, dass die vollständige Herabregulation von CD80/86 keinen Einfluss auf die Antikörperproduktion bei Proteoglykan-induzierter Arthritis hatte. Den ausbleibenden Effekt der Herabregulation von CD80/86 auf die Antikörperproduktion führten O'Neill et al. auf die alleinige Beteiligung autoreaktiver T-Lymphozyten zurück (O'Neill et al., 2007). Der in dieser Arbeit beobachtete signifikante Unterschied der CD86-Expression korrelierte nicht mit einem signifikanten Unterschied der ACPA-Titer bei RA Patienten.

B-Lymphozyten spielen bei der Pathogenese der RA eine besondere Rolle im Zusammenhang mit dem Fc γ RIIb

Die klinische Erfahrung sowie jüngste Publikationen legen nahe, dass B-Lymphozyten dennoch entscheidend am Krankheitsverlauf der RA beteiligt sind (Chu et al., 2014; Emery et al., 2014). Emery und Kollegen haben in ihrer Untersuchung herausgefunden, dass bei Therapieversagen von TNF α -Inhibitoren ein Wechsel zur Behandlung mit dem Antikörper Rituximab besser wirkt als die Anwendung eines alternativen TNF α -Inhibitors (Emery et al., 2014). Rituximab richtet sich gegen das Oberflächenprotein CD20 auf B-Lymphozyten und führt zur Deletion der Zellen. Eine Verbesserung des Krankheitsverlaufs unter Rituximab bestätigt, dass B-Lymphozyten an der Pathogenese der RA wesentlich beteiligt sind (Emery et al., 2014). Des Weiteren haben Chu et al. einen Antikörper getestet, der über den BCR die physiologische Phosphorylierung des Fc γ RIIb triggert. Gemessen an der Expression von CD86 kommt es zur Hemmung der Aktivierung der B-Lymphozyten (Chu et al., 2014). In der hier vorliegenden Untersuchung wurde eine verminderte CD86-Expression auf B-Lymphozyten bei RA-Patienten mit TM-Polymorphismus gemessen. Obwohl der Fc γ RIIb in seiner Funktion eingeschränkt ist, weisen diese Ergebnisse nicht auf eine fehlende Hemmung der B-Lymphozyten hin. Dieser Tatsache steht ebenfalls die Publikation von Catalan et al. entgegen. Die Arbeitsgruppe beschreibt bei RA-Patienten eine verminderte Expression des Fc γ RIIb auf Gedächtnis-B-Lymphozyten bei einem gleichzeitig erhöhten Anteil von CD86 positiven, naiven und Gedächtnis-B-Lymphozyten. Eine Korrelation zwischen der verminderten Expression von Fc γ RIIb und der Expression von CD86 auf B-Lymphozyten konnte in dieser Untersuchung jedoch nicht nachgewiesen werden (Catalan et al., 2010). In Ergänzung zur Untersuchung von Catalan et al. vermuten Mauri und Jury, dass der erhöhte Anteil von CD86 positiven, naiven B-Lymphozyten bei RA-Patienten eine Herabregulation von Fc γ RIIb bedingen könne (Catalan et al., 2010; Mauri und Jury, 2010). Bis heute gibt es keine Veröffentlichungen, welche sich mit dieser speziellen Fragestellung befassen. Zu dem ist anzumerken, dass die von Catalan und Kollegen durchgeführten Untersuchungen nicht die Funktionsfähigkeit der exprimierten Fc γ RIIb auf den B-Lymphozyten berücksichtigen. Ebenfalls ist die Ursache der verminderten Expression des Fc γ RIIb bei RA-Patienten nicht abschließend geklärt (Catalan et al., 2010). Für die von uns durchgeführte Untersuchung ist klar, dass Träger

des TM-Polymorphismus nachweislich einen funktionell beeinträchtigten Rezeptor bilden (Kono et al., 2005; Li et al., 2003). Somit kann davon ausgegangen werden, dass der Rezeptor sowohl auf B-Lymphozyten als auch auf allen anderen vorkommenden Zellen eine Dysfunktion aufweist (Nimmerjahn und Ravetch, 2008). Die vorliegende Studie kann die Annahme, dass ein im Transmembranabschnitt defekter FcγRIIb mit einer vermehrten Aktivierung der B-Lymphozyten (Hochregulation von CD86) in Zusammenhang steht, nicht konsolidieren (Catalan et al., 2010; Chu et al., 2014; O'Neill et al., 2007). Die gegensätzlichen Ergebnisse können durch eine unabhängige Expression des FcγRIIb und von CD86 bedingt sein. Die Unterschiede zu Catalan et al. ergeben sich bereits aus der unterschiedlichen Methodik. Die Arbeitsgruppe hat den prozentualen Anteil der CD86 positiven Zellen gemessen, während in der vorliegenden Untersuchung die Expressionsstärke anhand der MFI gemessen wurde (Catalan et al., 2010). Für die veröffentlichten Daten von Chu et al. muss beachtet werden, dass in dieser Datenerhebung die bekannten Polymorphismen im Gen des *FCGR2b* nicht berücksichtigt wurden, so dass offen bleibt, ob nicht auch eine Restaktivität der beeinträchtigten FcγRIIb für die Wirkung des monoklonalen Antikörpers ausreichend sein könnte (Chu et al., 2014). Die im Ergebnisteil dargestellte Expressionsstärke von CD86 auf B-Lymphozyten spricht dafür, dass Träger des TM-Polymorphismus weniger aktivierte B-Lymphozyten aufweisen (Mann et al., 2007). Der Zusammenhang zwischen der Beeinträchtigung des FcγRIIb durch ein seltenes Allel im TM-Exon und der Expression von CD86 auf B-Lymphozyten kann nicht abschließend geklärt werden. Nichtsdestotrotz liefern diese Erkenntnisse keinen Anhalt für einen gravierenderen Verlauf der RA bei Probanden mit TM-Polymorphismus. Um eine wissenschaftlich fundierte Aussage treffen zu können, sollte geprüft werden, ob ein direkter Zusammenhang zwischen der Expression von CD86 auf B-Lymphozyten und der Expression des FcγRIIb bei Trägern eines seltenen Allels im TM-Exon oder Promotor besteht.

Wie komplex die Interaktionen der einzelnen Oberflächenmoleküle sind und wie wichtig die Berücksichtigung der einzelnen Zellpopulationen ist, wird mit der Publikation von Yilmaz-Ellis und Kollegen verdeutlicht. Diese Veröffentlichung beschreibt im Mausmodell, dass die fehlende Expression von FcγRIIb auf B-Lymphozyten keine gesteigerte Anfälligkeit für eine Kollagen induzierte Arthritis (CIA) hervorrufe. Die zentrale Rolle der erhöhten Krankheitsanfälligkeit sowie eine gesteigerte Inzidenz der

CIA seien durch eine nicht balancierte Expression aktivierender und hemmender FcR auf myeloischen Effektorzellen, wie Makrophagen oder dendritische Zellen, bedingt (Yilmaz-Elis et al., 2014). Wie auch die vorliegenden Daten bestätigen, kann das Vorliegen der Allelvarianten im *FCGR2b* die Krankheitsentstehung der RA nicht verhindern, aber ein zwingend gravierenderer Verlauf wird dadurch ebenso wenig bestätigt.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die zellulären Mechanismen in der Pathogenese der RA unter Einfluss des Fc γ RIIb weiterhin unzureichend erforscht sind. Dennoch sprechen alle hier ausgewertete Daten gegen einen schwereren klinischen Verlauf der RA bei Trägern eines seltenen Allels. Zur Aufklärung der dazu führenden Mechanismen bedarf es weiterer wissenschaftlicher Projekte.

Die Anwesenheit einer Allelvariante korreliert mit einer verminderten Expression von CTLA-4 auf konventionellen T-Lymphozyten

An der Pathogenese der RA sind T-Lymphozyten wesentlich beteiligt (vergleiche 2.1.2). In diesem Zusammenhang ist die Expression von CTLA-4 in Abhängigkeit der Allelausprägungen im *FCGR2b* Gen untersucht worden. Wie in Kapitel 2.1.2 beschrieben, reguliert CTLA-4 die Aktivierung der T-Lymphozyten auf unterschiedlichen Wegen. Die konkurrierende Bindung mit CD28 an die Oberflächenmoleküle CD80/86, die Einleitung hemmender Signalkaskaden zum Arrest des Zellzyklus sowie die vorzeitige Beendigung der Interaktion von T-Lymphozyten mit APC stellen die wesentlichen Mechanismen dar, um die Aktivierung der T-Lymphozyten zu hemmen und so regulatorisch auf die T-Lymphozyten vermittelte Immunreaktion einzuwirken (Greene et al., 1996; Krummel und Allison, 1996; Linsley et al., 1996). Die vorliegende Datenerhebung hat gezeigt, dass auf konventionellen T-Lymphozyten bei Trägern der Allelvariante weniger CTLA-4 exprimiert wird. Dies könnte durch einen verminderten intrazellulären Speicher von CTLA-4 oder eine Beeinträchtigung der Externalisierung an die Zelloberfläche begründet sein. Zukünftige Forschungsprojekte könnten dazu beitragen diese und weiterführende Fragen zu klären.

Die Tatsache, dass Träger einer Allelvariante weniger CTLA-4 auf konventionellen T-Lymphozyten exprimieren, hat nach Jain und Kollegen eine verminderte Hemmung von aberranten oder auch pathogenen T-Lymphozyten zur Folge (Jain et al., 2010). Die verminderte Expression von CTLA-4 erlaubt die fortlaufende Proliferation von autoreaktiven T-Lymphozyten, so dass die Krankheitsentstehung sowie der Krank-

heitsfortschritt nicht verhindert werden können. Dies bestätigt die zentrale Rolle der T-Lymphozyten in der Entstehung und Unterhaltung der RA (Cope et al., 2007; Jain et al., 2010; Sakaguchi et al., 2012). Dennoch bedeutet eine verminderte Expression noch keinen absoluten Funktionsverlust des Moleküls, so dass aufgrund dessen kein gravierender Krankheitsverlauf bei Trägern eines seltenen Allels vermutet werden kann. Zudem ist aus Mausexperimenten bekannt, dass regulatorische T-Lymphozyten von *Ctla4^{-/-}*-Mäusen die Aktivierung konventioneller T-Lymphozyten *in vitro* unterdrücken können (Tang et al., 2004). Dies lässt vermuten, dass nicht allein die Expression von CTLA-4 ausschlaggebend für die nachfolgende durch T-Lymphozyten vermittelte Immunreaktion ist.

Das Vorliegen des Transmembranpolymorphismus korreliert mit der niedrigsten CTLA-4-Expression auf regulatorischen T-Lymphozyten

Neben konventionellen T-Lymphozyten ist die Expression von CTLA-4 auf regulatorischen T-Lymphozyten evaluiert worden. Die Expression des Moleküls auf regulatorischen T-Lymphozyten steht in enger Wechselwirkung mit der untersuchten Expression von CD80 und CD86 auf B-Lymphozyten (vergleiche 2.1.2). Die Expression von CTLA-4 auf regulatorischen T-Lymphozyten unterscheidet sich signifikant zwischen Trägern eines seltenen Allels im TM-Exon und im Promotor. Die Allelvarianten korrelieren gegensätzlich mit der Expressionsstärke von CTLA-4. Der Transmembranpolymorphismus ist mit der niedrigsten Expression von CTLA-4 assoziiert. Wenig CTLA-4 auf der Zelloberfläche führt zu einem Ungleichgewicht der T-Lymphozyten-Population und sollte eine verminderte Expression von CD80/86 nach sich ziehen (Flores-Borja et al., 2008; Qureshi et al., 2011). Diese Beobachtung kann anhand der vorliegenden Untersuchung nicht bestätigt werden. Probanden mit TM-Polymorphismus weisen zwar eine signifikant verminderte Expression von CD86 auf, während jedoch die Expression von CD80 nicht signifikant verändert ist. Der TM-Polymorphismus ist demnach mit einer verminderten Expression der Interaktionspartner CTLA-4 und CD86 assoziiert. Ob es zu Auswirkungen des TM-Polymorphismus im *FCGR2b* auf die molekulare Interaktion sowie die Oberflächenexpression von CD86 und CTLA-4 kommt und wie sich eventuelle Effekte niederschlagen, bleibt offen. In welchem wegweisenden Zusammenhang die gleichgerichtete Herabregulation von CTLA-4 und CD86 bei Trägern eines seltenen Allels mit der humanen rheumatoiden Arthritis steht, sollte im Rahmen weiterer Forschungsprojek-

te geklärt werden. Eine mögliche Interpretation der gleichgerichteten, verminderten Expression von CD86 und CTLA-4 könnte sein, dass durch weniger CD86 die Bindung von CTLA-4 mit CD80 effektiver verläuft und deshalb CTLA-4 weniger stark exprimiert werden muss. So würde trotzdem eine suppressive Funktion von regulatorischen T-Lymphozyten ausgeübt werden können (Sansom et al., 2003).

Für die Allelvariante im Promotor wurde hingegen eine signifikant vermehrte Expression von CD80 auf B-Lymphozyten im Vergleich zu Trägern ausschließlich häufiger Allele festgestellt. Die Expression von CTLA-4 ist signifikant höher gegenüber Trägern des seltenen Allels im TM-Exon. Diese beiden Ergebnisse lassen in Verbindung mit den Erkenntnissen von Zheng und Qureshi eine gute suppressive Funktion der regulatorischen T-Lymphozyten vermuten (Qureshi et al., 2011; Zheng et al., 2004). Trotz unterschiedlicher Einflüsse auf die Expression der Oberflächenmoleküle zur Regulation der T-Lymphozyten-Antwort liefert weder das Vorliegen des Promotor- noch des TM-Polymorphismus einen sicheren Anhalt für eine Assoziation mit einem schwereren Krankheitsverlauf der RA.

Polymorphismen im FCGR2b-Gen spielen eine Rolle bei infektiös-entzündlichen Erkrankungen

Mit den Auswirkungen der Polymorphismen hat man sich auch im Zusammenhang mit infektiösen Erkrankungen beschäftigt. In Malaria-Endemiegebieten haben Untersuchungen der Polymorphismen darauf hingewiesen, dass Träger des TM-Polymorphismus einen Schutz gegenüber schweren Malariaerkrankungen besitzen. Eine Korrelation zum Promotorpolymorphismus besteht nicht, da Träger eines seltenen Allels im Promotor in der untersuchten Kohorte so gut wie nicht vorkamen (Willcocks et al., 2010). Neben parasitären Erkrankungen wurden im Mausmodell auch bakterielle Infektionen untersucht. Dort wurde bei Mäusen ohne *fcγRIIb* eine gesteigerte Phagozytoseaktivität der Makrophagen gegenüber *Streptokokkus pneumoniae* beobachtet (Clatworthy und Smith, 2004). Ein etwaiger Selektionsvorteil durch Polymorphismen im *FCGR2b* gegenüber bakteriellen Infektionen konnte in einer Untersuchung der kenianischen Bevölkerung nicht bestätigt werden (Clatworthy und Smith, 2004). Wenngleich kontroverse Ergebnisse zum Einfluss der Einzelnukleotidveränderungen im TM-Exon des *FCGR2b* auf die Phagozytoseaktivität der Makrophagen beziehungsweise die Antwort des angeborenen Immunsystems veröffentlicht wurden, könnte dies einen Erklärungsansatz für die hier erhobenen Ergebnisse bie-

ten. Aus jüngsten Publikationen ist bekannt, dass Infektionserreger wie *Porphyromonas gingivalis* Risikofaktoren für die Entstehung der RA darstellen (Scher et al., 2014). Im Falle der multifaktoriellen Genese der RA liegt unter Berücksichtigung der aktuell erhobenen Ergebnisse die Vermutung nahe, dass die Allelvarianten einen Vorteil gegenüber infektiösen Risikofaktoren der RA darstellen könnten. Vermutlich könnten die von Scher und Kollegen beschriebenen infektiös-entzündlichen Komponenten der Krankheitsentstehung bei Vorliegen des TM-Polymorphismus besser bewältigt werden (Scher et al., 2014). Eine weitere Erklärung für die vermeintlich mildere Krankheitsaktivität könnte eine gesteigerte antigenspezifische Phagozytoseaktivität von Makrophagen sein, wie sie bereits im murinen Modell der RA nachgewiesen wurde (Clatworthy und Smith, 2004). Dennoch kann aufgrund der multifaktoriellen Genese die Krankheitsentstehung der RA durch das alleinige Vorliegen der Allelvariante scheinbar nicht verhindert werden. Ob bei europäischen RA-Patienten mit Allelvariante im *FCGR2b* tatsächlich eine gesteigerte Phagozytoseaktivität des angeborenen Immunsystems vorliegt, wurde in der vorliegenden Studie nicht untersucht. Der genaue Zusammenhang zwischen TM-Polymorphismus und der infektiös-inflammatorischen Komponente der RA sollte in zukünftigen Forschungsprojekten näher analysiert werden. Ein möglicher Untersuchungsansatz wäre die Evaluierung von RA-Patienten mit Allelvariante auf ihre Exposition gegenüber bekannten Risikofaktoren, die zur entzündlichen Genese der RA beitragen (Klareskog et al., 2010).

Zusammenfassung der Diskussion

Für die erhobenen Ergebnisse kann konstatiert werden, dass die erwartete negative Korrelation der genetischen Veränderung im *FCGR2b*-Gen mit der RA ausbleibt. Die vorliegenden Ergebnisse untermauern die von Radstake et al. festgestellte gravierendere Gelenkdestruktion bei RA-Patienten mit TM-Polymorphismus nicht (Radstake et al., 2006). Auch konnte die für Taiwanesen ermittelte gesteigerte Antikörperproduktion bei RA-Patienten mit seltenem Allel im TM-Exon nicht bestätigt werden (Chen et al., 2008). Ebenso wenig liefern die Ergebnisse einen Anhalt für eine im Mausexperiment festgestellte, gesteigerte Inzidenz und erhöhte Krankheitsanfälligkeit für CIA (Yilmaz-Elis et al., 2014). Die erhobenen Daten vermitteln den Anschein, dass die Effekte der Polymorphismen, welche zur Assoziation des SLE beitragen, für die Genese der RA eher eine untergeordnete Rolle spielen. Im Falle der RA müssen vor allem die infektiös-entzündlichen Einflussfaktoren wie Rauchen oder Parodonti-

tis-Erreger im Hinblick auf die Pathogenese der Erkrankung und die Wechselwirkung der Polymorphismen berücksichtigt werden (Klareskog et al., 2010; Scher et al., 2014). Wie bereits erwähnt, stellt der TM-Polymorphismus einen Selektionsvorteil in Malariagebieten dar. Für die untersuchte Kohorte kann demnach vermutet werden, dass mit hoher Wahrscheinlichkeit der TM-Polymorphismus mit der entzündlichen Genese der RA assoziiert ist.

Kritische Einordnung der Ergebnisse

Für die allgemeine Interpretation der Ergebnisse sollte kritisch berücksichtigt werden, dass die Datenangaben nicht für alle untersuchten Proben vollständig waren. Daraus haben sich für einzelne Aspekte unterschiedliche Gruppengrößen ergeben. Dies wurde jedoch bei der Wahl der statistischen Methoden berücksichtigt, so dass alle Ergebnisse aussagekräftig sind.

Die retrospektive Datenerhebung war geeignet, um die im Vorfeld aufgestellte Hypothese, RA-Patienten mit einem seltenen Allel erleben einen gravierenden Verlauf der Erkrankung, empirisch zu überprüfen. Eine prospektive Studie wäre in der Lage Kausalzusammenhänge dieser Hypothese zu prüfen und würde die Fehlerquellen minimieren. Um einen grundsätzlichen Forschungsbedarf für die Zusammenhänge zwischen *FCGR2b* Polymorphismen und den klinischen Ausprägungen der RA zu testen, war die retrospektive Datenerhebung ein probates Mittel. So liefert diese Arbeit einen richtungsweisenden Beitrag zu aktuellen Forschungsthemen der RA und wirft weitere Fragen zum Ablauf pathogenetischer Prozesse und zu ihren Einflüssen auf die Ausprägung klinischer Symptome der RA auf.

6 Fazit und Ausblick

Die vorliegende Arbeit konnte die Hypothese, dass die Ausprägung von Polymorphismen im TM-Exon und Promotor des *FCGR2b*-Gens bei RA-Patienten mit einem aggressiveren Verlauf der Erkrankung assoziiert ist, widerlegen. Gleichmaßen konnte die Hypothese, RA-Patienten mit Allelvariante unterscheiden sich in klinischen und laborchemischen Merkmalen von Wildtyp-Trägern, nicht bestätigt werden. Darüber hinaus wurde festgestellt, dass die Expression von Oberflächenmolekülen auf Lymphozyten in Abhängigkeit des anwesenden Polymorphismus variiert.

Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern einen wertvollen Beitrag zum weiteren Verständnis der komplexen Zusammenhänge in der Pathogenese der RA. Wenngleich diese Erkenntnisse viele neue Fragen aufgeworfen haben.

In der untersuchten Kohorte wiesen Träger eines seltenen Allels weder höhere ACPA-Titer noch CRP-Spiegel auf. Gleichzeitig wurden niedrigere IL-6 Serumspiegel, ein späterer Krankheitsbeginn und ein höherer Anteil der Behandlung mittels Basistherapeutika festgestellt. Dies lässt den Rückschluss zu, dass das Vorliegen einer Allelvariante bei ACPA positiven RA-Patienten eher einen Vorteil für den Krankheitsverlauf darstellt.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine unterschiedliche Korrelation der *FCGR2b* Polymorphismen mit der Expression von kostimulatorischen Oberflächenmolekülen auf B-Lymphozyten beobachtet. Daraus kann die Frage abgeleitet werden, ob eine Interaktion zwischen B- und T-Lymphozyten zu beobachten ist. Würde sich die Annahme bestätigen, dass die Interaktion zwischen den Lymphozyten mit der Anwesenheit der Polymorphismen korreliert, sollte in weiterführenden Untersuchungen geklärt werden, welchen Beitrag molekularen Mechanismen zur Interaktion von B- und T-Lymphozyten in diesem spezifischen Fall leisten. Dabei sollte im Focus der Analyse die spezifische Rolle der B-Lymphozyten und deren Aktivierungsgrad sowie die Funktion der regulatorischen T-Lymphozyten stehen. Die Umsetzung dieser Erkenntnisse auf therapeutische Maßnahmen zur Eindämmung der Autoimmunreaktion bei der RA wäre der nächste logische Schritt, zu dem diese Arbeit den Anstoß geben kann.

V. Anhang

ID	TM Geno- typ	PR Geno- typ	Gruppeneinteilung	Serum IL6	Serum IL10	CRP	Alter bei Erstdia- gnose	DAS28	Cortisol- spiegel
24	TT	GG	Kontrolle	NA	NA	5,60	29	NA	NA
34	TC	GG	SNP Träger TM	NA	NA	8,20	49	NA	NA
35	CC	NA	SNP Träger TM	NA	NA	45,90	86	4,96	NA
38	TT	GC	SNP Träger PR	NA	NA	43,70	52	7,14	NA
43	NA	GG	ausgeschlossen	NA	NA	3,00	31	4,87	NA
44	TT	GG	Kontrolle	NA	NA	33,20	78	NA	NA
45	TT	GG	Kontrolle	NA	NA	5,05	33	NA	NA
46	TT	GG	Kontrolle	NA	NA	46,85	54	NA	NA
47	CC	GG	SNP Träger TM	NA	NA	9,75	58	NA	NA
50	TT	NA	ausgeschlossen	NA	NA	33,05	54	NA	NA
51	TT	GC	SNP Träger PR	NA	NA	105,28	39	7,10	NA
52	TT	GG	Kontrolle	NA	NA	4,88	44	7,60	NA
53	TT	GG	Kontrolle	NA	NA	10,12	49	7,10	NA
54	TT	GG	Kontrolle	NA	NA	28,33	44	6,40	NA
56	TT	GG	Kontrolle	NA	NA	4,06	33	5,40	NA
57	CC	GG	SNP Träger TM	NA	NA	108,50	60	NA	NA
58	TT	GG	Kontrolle	NA	NA	3,47	59	NA	NA
59	TT	GG	Kontrolle	NA	NA	41,80	27	NA	NA
60	TC	NA	SNP Träger TM	NA	NA	0,00	NA	NA	NA
61	TT	GG	Kontrolle	NA	NA	3,13	47	NA	NA
62	TC	GG	SNP Träger TM	NA	NA	23,67	61	NA	NA
63	TT	GG	Kontrolle	NA	NA	8,30	62	NA	NA
65	TT	GG	Kontrolle	NA	NA	3,00	26	NA	NA
66	TT	NA	ausgeschlossen	NA	NA	5,15	48	NA	NA
67	TT	NA	ausgeschlossen	NA	NA	19,50	39	NA	NA
68	TT	NA	ausgeschlossen	NA	NA	4,60	50	NA	NA
69	TT	GG	Kontrolle	NA	NA	3,13	29	NA	NA
70	TT	GG	Kontrolle	NA	NA	5,27	37	NA	NA
71	TT	GG	Kontrolle	NA	NA	3,00	36	NA	NA
72	TT	GG	Kontrolle	NA	NA	3,00	42	NA	NA
74	TT	GG	Kontrolle	NA	NA	4,47	66	NA	NA
75	TT	GG	Kontrolle	NA	NA	5,85	65	NA	NA
79	TT	GC	SNP Träger PR	NA	NA	4,73	45	NA	NA
80	TT	NA	ausgeschlossen	NA	NA	39,15	54	NA	NA
81	TC	GG	SNP Träger TM	NA	NA	4,65	44	NA	NA
83	TT	GG	Kontrolle	NA	NA	18,20	73	NA	NA
84	TC	GG	SNP Träger TM	NA	NA	57,35	49	NA	NA
85	TT	GG	Kontrolle	NA	NA	13,80	73	NA	NA
86	TT	GG	Kontrolle	NA	NA	61,85	22	5,64	NA
88	TT	CC	SNP Träger PR	NA	NA	73,55	40	NA	NA
89	TT	GG	Kontrolle	NA	NA	13,35	45	NA	NA
91	TT	GG	Kontrolle	NA	NA	55,60	32	7,49	NA
92	NA	GG	ausgeschlossen	NA	NA	15,35	48	NA	NA
95	TC	GC	SNP Träger TM/PR	NA	NA	19,33	64	NA	NA
97	TT	GG	Kontrolle	NA	NA	3,80	35	NA	NA

ID	anti CCP IgG1	anti CCP IgG4	anti MCV IgG1	anti MCV IgG4	CTx1	CTLA4 konvTC	CTLA4 regTC	CD86 naivBC	CD86 GedBC	CD80 GedBC
24	1,37	0,09	0,16	0,04	NA	NA	NA	NA	NA	NA
34	1,78	0,93	0,09	0,39	NA	NA	NA	NA	NA	NA
35	1,24	0,22	0,08	0,04	NA	NA	NA	NA	NA	NA
38	1,40	1,58	0,34	0,57	NA	NA	NA	NA	NA	NA
43	0,12	0,05	0,03	0,04	NA	NA	NA	NA	NA	NA
44	0,97	1,25	0,08	0,26	NA	NA	NA	NA	NA	NA
45	0,90	0,05	0,15	0,02	NA	NA	NA	NA	NA	NA
46	0,50	0,11	0,04	0,02	NA	NA	NA	NA	NA	NA
47	0,00	0,00	0,00	0,00	NA	NA	NA	NA	NA	NA
50	0,68	0,76	0,08	0,68	NA	NA	NA	NA	NA	NA
51	0,41	0,07	0,11	0,10	NA	NA	NA	NA	NA	NA
52	1,03	0,08	0,09	0,04	NA	NA	NA	NA	NA	NA
53	0,37	0,06	0,04	0,03	NA	NA	NA	NA	NA	NA
54	0,25	0,05	0,03	0,02	NA	NA	NA	NA	NA	NA
56	0,65	0,10	0,05	0,02	NA	NA	NA	NA	NA	NA
57	0,00	0,00	0,00	0,00	NA	NA	NA	NA	NA	NA
58	0,53	0,10	0,06	0,14	NA	NA	NA	NA	NA	NA
59	0,08	0,09	0,20	0,43	NA	NA	NA	NA	NA	NA
60	2,02	0,48	0,19	0,71	NA	NA	NA	NA	NA	NA
61	0,00	0,00	0,00	0,00	NA	NA	NA	NA	NA	NA
62	0,78	0,27	0,06	0,02	NA	NA	NA	NA	NA	NA
63	1,53	1,54	0,21	1,35	NA	NA	NA	NA	NA	NA
65	2,01	0,04	0,97	0,02	NA	NA	NA	NA	NA	NA
66	1,60	0,21	0,92	0,37	NA	NA	NA	NA	NA	NA
67	0,62	0,06	0,04	0,03	NA	NA	NA	NA	NA	NA
68	0,70	0,05	0,08	0,03	NA	NA	NA	NA	NA	NA
69	1,21	0,09	0,12	0,04	NA	NA	NA	NA	NA	NA
70	0,92	0,04	0,05	0,02	NA	NA	NA	NA	NA	NA
71	0,44	0,05	0,04	0,02	NA	NA	NA	NA	NA	NA
72	0,24	0,09	0,04	0,05	NA	NA	NA	NA	NA	NA
74	0,47	0,41	0,07	0,12	NA	NA	NA	NA	NA	NA
75	1,35	0,14	0,14	0,07	NA	NA	NA	NA	NA	NA
79	0,27	0,08	0,03	0,03	NA	NA	NA	NA	NA	NA
80	0,92	2,54	0,13	0,58	NA	NA	NA	NA	NA	NA
81	0,55	0,50	0,07	0,05	NA	NA	NA	NA	NA	NA
83	0,87	1,11	0,23	1,18	NA	NA	NA	NA	NA	NA
84	1,87	1,64	0,13	0,28	NA	NA	NA	NA	NA	NA
85	0,58	1,04	0,15	1,00	NA	NA	NA	NA	NA	NA
86	0,67	0,28	0,53	0,77	NA	NA	NA	NA	NA	NA
88	0,67	0,10	0,11	0,15	NA	NA	NA	NA	NA	NA
89	1,43	0,11	0,10	0,05	NA	NA	NA	NA	NA	NA
91	1,29	0,21	0,04	0,03	NA	NA	NA	NA	NA	NA
92	1,16	0,31	0,16	0,20	NA	NA	NA	NA	NA	NA
95	1,59	0,09	0,78	0,06	NA	NA	NA	NA	NA	NA
97	0,58	1,09	0,10	0,12	NA	NA	NA	NA	NA	NA

ID	TM Geno- typ	PR Geno- typ	Gruppeneinteilung	Serum IL6	Serum IL10	CRP	Alter bei Erstdia- gnose	DAS28	Cortisol- spiegel
98	TC	GG	SNP Träger TM	NA	NA	67,25	76	NA	NA
99	TT	GG	Kontrolle	NA	NA	7,83	34	NA	NA
100	TT	GG	Kontrolle	NA	NA	7,55	32	NA	NA
101	TT	GG	Kontrolle	NA	NA	5,95	NA	NA	NA
106	TT	NA	ausgeschlossen	NA	NA	23,30	60	NA	NA
111	TT	GC	SNP Träger PR	NA	NA	53,48	NA	NA	NA
113	TT	GG	Kontrolle	NA	NA	28,80	NA	NA	NA
116	TT	GG	Kontrolle	NA	NA	6,75	35	NA	NA
120	TC	GG	SNP Träger TM	NA	NA	12,40	NA	NA	NA
20058	TT	GG	Kontrolle	NA	NA	0,00	NA	0,00	NA
20060	TT	GG	Kontrolle	NA	NA	0,00	NA	0,00	NA
20067	TT	GC	SNP Träger PR	NA	NA	0,00	NA	0,00	NA
20068	TT	GC	SNP Träger PR	NA	NA	0,00	NA	0,00	NA
20069	NA	GG	ausgeschlossen	NA	NA	0,00	NA	0,00	NA
RA001	TT	NA	ausgeschlossen	0,00	0,00	28,70	NA	5,71	NA
RA002	TT	GG	Kontrolle	24,89	0,00	56,40	NA	5,01	NA
RA003	TT	GC	SNP Träger PR	0,00	0,00	2,10	59,71	1,79	0,0
RA004	CC	GG	SNP Träger TM	0,00	0,00	2,00	33,96	1,92	4,0
RA005	NA	GG	ausgeschlossen	0,00	0,00	5,60	71,03	1,92	12,5
RA006	TT	GC	SNP Träger PR	0,00	0,00	2,40	61,45	2,38	5,0
RA007	TT	NA	ausgeschlossen	0,00	0,00	2,30	56,94	1,95	2,0
RA008	CC	GC	SNP Träger TM/PR	0,00	0,00	4,30	42,44	3,89	0,0
RA009	NA	NA	ausgeschlossen	24,84	140,36	4,40	52,93	2,13	0,0
RA010	TC	GG	SNP Träger TM	2,45	0,00	4,20	60,43	1,97	2,0
RA011	TC	GG	SNP Träger TM	106,03	0,00	0,02	43,92	3,57	0,0
RA012	TC	GG	SNP Träger TM	2,29	6,58	16,00	43,08	2,82	2,0
RA013	TT	GG	Kontrolle	12,45	0,00	0,00	34,9	NA	1,0
RA014	NA	GG	ausgeschlossen	0,00	0,00	0,50	14,9	1,11	4,0
RA015	TT	GG	Kontrolle	39,80	0,00	1,70	42,88	1,60	0,0
RA016	NA	GG	ausgeschlossen	50,04	2,88	0,49	63,88	1,52	0,0
RA017	TT	GG	Kontrolle	13,33	0,00	3,90	42,88	2,51	2,0
RA018	TT	GG	Kontrolle	19,81	79,44	3,90	44,88	2,65	5,0
RA019	TT	GG	Kontrolle	34,60	0,00	13,50	46,46	4,29	5,0
RA020	TT	GG	Kontrolle	0,00	0,00	0,60	59,87	2,09	0,0
RA021	TT	GG	Kontrolle	77,96	0,00	0,30	35,86	3,65	4,0
RA022	TT	GG	Kontrolle	0,00	0,00	4,20	48,86	1,97	0,0
RA023	TT	GG	Kontrolle	58,12	0,00	144,00	35,86	3,73	6,0
RA025	NA	GC	SNP Träger PR	0,00	0,00	0,90	55,86	NA	3,0
RA026	TC	GC	SNP Träger TM/PR	3,33	0,00	5,50	64,84	1,63	0,0
RA027	TT	GG	Kontrolle	28,12	0,00	1,70	41,84	4,55	0,0
RA028	TT	GG	Kontrolle	35,64	0,00	14,60	80,59	3,21	5,0
RA029	TT	GC	SNP Träger PR	0,00	0,00	NA	NA	NA	NA
RA030	TT	GG	Kontrolle	5,81	0,00	9,40	76,83	0,90	5,0

ID	anti CCP IgG1	anti CCP IgG4	anti MCV IgG1	anti MCV IgG4	CTx1	CTLA4 konvTC	CTLA4 regTC	CD86 naivBC	CD86 GedBC	CD80 GedBC
98	0,69	0,23	0,06	0,12	NA	NA	NA	NA	NA	NA
99	0,39	0,08	0,06	0,02	NA	NA	NA	NA	NA	NA
100	1,50	0,23	0,05	0,02	NA	NA	NA	NA	NA	NA
101	1,55	0,28	0,42	0,10	NA	NA	NA	NA	NA	NA
106	0,55	0,04	0,12	0,02	NA	NA	NA	NA	NA	NA
111	1,28	0,76	0,07	0,40	NA	NA	NA	NA	NA	NA
113	1,35	1,09	0,22	0,27	NA	NA	NA	NA	NA	NA
116	0,46	0,72	0,13	0,17	NA	NA	NA	NA	NA	NA
120	0,70	0,44	0,19	0,87	NA	NA	NA	NA	NA	NA
20058	0,46	2,00	0,12	0,43	NA	NA	NA	NA	NA	NA
20060	1,35	4,75	0,36	2,91	NA	NA	NA	NA	NA	NA
20067	0,14	0,12	0,05	0,03	NA	NA	NA	NA	NA	NA
20068	1,06	0,51	0,11	0,08	NA	NA	NA	NA	NA	NA
20069	0,31	0,14	0,33	0,06	NA	NA	NA	NA	NA	NA
RA001	1,89	2,34	1,27	1,05	0,48	NA	NA	155	134	110
RA002	1,16	1,94	0,53	0,54	1,40	NA	NA	280	181	131
RA003	0,83	0,12	0,33	0,07	2,62	NA	NA	75	64	238
RA004	1,94	0,09	0,31	0,01	0,69	NA	NA	18	6	0
RA005	0,98	0,41	0,41	0,14	1,32	NA	NA	97	61	140
RA006	0,02	0,02	0,08	0,01	1,41	NA	NA	105	95	136
RA007	0,68	2,10	0,06	0,03	1,86	NA	NA	31	35	48
RA008	1,10	0,06	0,84	0,04	2,20	NA	NA	36	53	11
RA009	0,02	0,01	0,03	0,01	1,86	46	613	33	49	31
RA010	1,78	0,12	0,15	0,01	1,72	83	492	43	57	143
RA011	0,02	0,01	0,02	0,01	2,01	86	742	41	37	12
RA012	1,66	2,00	0,39	0,25	2,02	80	671	32	17	134
RA013	0,35	0,01	0,06	0,01	0,96	130	2811	243	51	112
RA014	0,35	0,10	0,25	0,08	0,12	95	1028	37	44	35
RA015	0,52	0,45	0,77	0,23	1,88	78	809	44	48	27
RA016	0,52	0,06	0,33	0,03	2,13	59	674	38	39	74
RA017	2,08	2,57	0,89	1,03	2,62	109	637	40	44	124
RA018	1,72	0,17	0,22	0,24	1,97	103	838	84	66	73
RA019	1,81	1,06	0,78	0,08	2,21	85	966	29	43	100
RA020	1,82	0,08	0,98	0,02	1,79	50	671	27	35	109
RA021	1,70	1,39	0,72	0,28	1,98	106	847	92	134	167
RA022	2,11	1,18	1,75	0,36	2,80	127	921	82	119	117
RA023	0,02	0,03	0,03	0,01	1,81	232	875	48	76	102
RA025	1,77	0,99	0,16	0,02	2,20	77	761	83	139	147
RA026	2,13	0,03	1,65	0,04	1,98	51	447	98	139	212
RA027	2,00	1,38	0,88	0,87	3,29	132	974	136	251	71
RA028	1,81	0,35	0,80	0,06	2,70	123	891	90	128	152
RA029	0,50	1,12	0,30	0,06	2,67	90	1365	134	234	211
RA030	2,03	0,02	0,92	0,02	1,72	126	907	135	268	132

ID	TM Geno- typ	PR Geno- typ	Gruppeneinteilung	Serum IL6	Serum IL10	CRP	Alter bei Erstdia- gnose	DAS28	Cortisol- spiegel
RA031	TT	GC	SNP Träger PR	0,00	0,00	5,60	46,83	4,53	4,0
RA032	TT	GG	Kontrolle	1,33	12,14	1,40	78,4	2,68	5,0
RA033	TT	GC	SNP Träger PR	38,28	0,00	2,40	44,81	1,68	2,0
RA034	TC	GG	SNP Träger TM	102,99	0,00	6,20	62,8	NA	5,0
RA037	TT	GG	Kontrolle	230,81	0,00	29,00	53,19	3,93	5,0
RA038	TT	GC	SNP Träger PR	182,18	0,00	36,50	31,78	4,13	10,0
RA039	TT	GG	Kontrolle	0,00	5,35	7,30	45,94	3,66	5,0
RA040	TT	GC	SNP Träger PR	0,00	0,00	7,70	63,11	4,11	10,0
RA041	NA	GG	ausgeschlossen	5,89	4,94	20,90	58,93	3,88	3,0
RA045	NA	GG	ausgeschlossen	1,97	0,00	31,10	46,72	7,07	7,0
RA046	TC	GC	SNP Träger TM/PR	0,00	0,00	0,40	30,14	1,11	0,0
RA047	TT	GG	Kontrolle	168,18	670,11	NA	52,72	NA	5,0
RA048	TT	GC	SNP Träger PR	4,77	0,00	3,00	63,29	2,30	5,0
RA049	TT	GG	Kontrolle	41,72	13,38	19,00	40,71	NA	10,0
RA052	TT	GC	SNP Träger PR	0,00	0,00	7,30	57,7	1,67	0,0
RA053	TT	GC	SNP Träger PR	0,00	0,00	NA	56,95	NA	4,0
RA061	TC	GG	SNP Träger	0,00	0,00	6,90	28,18	2,69	2,0

ID	anti CCP IgG1	anti CCP IgG4	anti MCV IgG1	anti MCV IgG4	CTx1	CTLA4 konvTC	CTLA4 regTC	CD86 naivBC	CD86 GedBC	CD80 GedBC
RA031	0,02	0,01	0,04	0,01	2,80	107	1037	84	103	103
RA032	0,91	0,01	0,20	0,01	1,28	80	1026	106	129	63
RA033	2,44	0,11	0,94	0,13	1,87	109	1444	131	141	125
RA034	2,91	1,72	1,47	1,26	3,80	54	1019	103	91	194
RA037	0,03	0,04	0,05	0,10	0,92	104	1087	59	49	152
RA038	1,59	2,72	0,40	0,11	1,36	90	9467	44	67	56
RA039	2,56	0,55	0,94	0,07	0,41	79	857	81	117	219
RA040	2,49	1,84	0,63	0,19	2,50	-12	685	63	81	163
RA041	2,14	2,85	1,40	0,17	1,38	124	1100	53	79	107
RA045	2,92	0,83	3,57	0,98	1,18	165	1286	67	92	118
RA046	0,59	0,09	0,29	0,06	1,55	83	1569	59	76	131
RA047	0,95	0,10	0,98	0,05	1,84	78	877	47	75	61
RA048	0,17	0,17	0,09	0,04	0,94	86	846	42	82	147
RA049	2,11	0,80	0,45	0,16	2,92	88	1107	73	94	154
RA052	0,93	0,49	0,46	0,04	1,49	66	1343	80	96	278
RA053	0,10	0,10	0,06	0,02	3,01	72	1637	62	115	260
RA061	2,64	1,84	1,84	0,52	1,12	116	945	36	62	117

VI. Literaturverzeichnis

- Albani, S., and Carson, D.A. (1996). A multistep molecular mimicry hypothesis for the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Immunol. Today* 17, 466–470.
- Aletaha, D., Neogi, T., Silman, A.J., Funovits, J., Felson, D.T., Bingham, C.O., Birnbaum, N.S., Burmester, G.R., Bykerk, V.P., Cohen, M.D., et al. (2010). 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: An American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum.* 62, 2569–2581.
- Amos, R.S., Constable, T.J., Crockson, R.A., Crockson, A.P., and McConkey, B. (1977). Rheumatoid arthritis: relation of serum C-reactive protein and erythrocyte sedimentation rates to radiographic changes. *Br. Med. J.* 1, 195–197.
- Blank, M.C., Stefanescu, R.N., Masuda, E., Marti, F., King, P.D., Redecha, P.B., Wurzburger, R.J., Peterson, M.G.E., Tanaka, S., and Pricop, L. (2005). Decreased transcription of the human FCGR2B gene mediated by the -343 G/C promoter polymorphism and association with systemic lupus erythematosus. *Hum. Genet.* 117, 220–227.
- Bolland, S., Pearse, R.N., Kurosaki, T., and Ravetch, J.V. (1998). SHIP Modulates Immune Receptor Responses by Regulating Membrane Association of Btk. *Immunity* 8, 509–516.
- Bortz, P.D.J., and Schuster, P.D.C. (2010). Hypothesentesten. In *Statistik für Human- und Sozialwissenschaftler*, (Springer Berlin Heidelberg), pp. 97–116.
- Boruchov, A.M., Heller, G., Veri, M.-C., Bonvini, E., Ravetch, J.V., and Young, J.W. (2005). Activating and inhibitory IgG Fc receptors on human DCs mediate opposing functions. *J. Clin. Invest.* 115, 2914–2923.
- Brizzolara, R., Soldano, S., Montagna, P., Sulli, A., Serio, B., Villaggio, B., Triolo, P.F., Clerico, P., Felli, L., Molfetta, L., et al. (2011). [CTLA4-Ig interferes and downregulates the proinflammatory activities of rheumatoid synovial macrophages in monoculture]. *Reumatismo* 63, 80–85.
- Brune, K., and Manger, B. (2010). Rheumatische Erkrankungen. In *Pharmakotherapie*, B. Lemmer, and K. Brune, eds. (Springer Berlin Heidelberg), pp. 339–353.
- Carreno, B.M., and Collins, M. (2002). The B7 family of ligands and its receptors: new pathways for costimulation and inhibition of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 20, 29–53.
- Castell, J.V., Gómez-Lechón, M.J., David, M., Andus, T., Geiger, T., Trullenque, R., Fabra, R., and Heinrich, P.C. (1989). Interleukin-6 is the major regulator of acute phase protein synthesis in adult human hepatocytes. *FEBS Lett.* 242, 237–239.
- Catalan, D., Aravena, O., Sabugo, F., Wurmman, P., Soto, L., Kalergis, A.M., Cuchacovich, M., and Aguillon, J.C. (2010). B cells from rheumatoid arthritis patients show important alterations in the

- expression of CD86 and FcγRIIb, which are modulated by anti-tumor necrosis factor therapy. *Arthritis Res. Ther.* 12, R68.
- Chen, J.-Y., Wang, C.-M., Ma, C.-C., Hsu, L.-A., Ho, H.-H., Wu, Y.-J.J., Kuo, S.-N., and Wu, J. (2008). A transmembrane polymorphism in FcγRIIb (FCGR2B) is associated with the production of anti-cyclic citrullinated peptide autoantibodies in Taiwanese RA. *Genes Immun.* 9, 680–688.
- Chu, S.Y., Yeter, K., Kotha, R., Pong, E., Miranda, Y., Phung, S., Chen, H., Lee, S.-H., Leung, I., Bonzon, C., et al. (2014). Suppression of Rheumatoid Arthritis B Cells by XmAb5871, an Anti-CD19 Antibody That Coengages B Cell Antigen Receptor Complex and Fcγ Receptor IIb Inhibitory Receptor. *Arthritis Rheumatol.* Hoboken NJ 66, 1153–1164.
- Clarke, A., and Vyse, T.J. (2009). Genetics of rheumatic disease. *Arthritis Res. Ther.* 11, 248.
- Clatworthy, M.R., and Smith, K.G.C. (2004). FcγRIIb balances efficient pathogen clearance and the cytokine-mediated consequences of sepsis. *J. Exp. Med.* 199, 717–723.
- Clatworthy, M.R., Willcocks, L., Urban, B., Langhorne, J., Williams, T.N., Peshu, N., Watkins, N.A., Floto, R.A., and Smith, K.G.C. (2007). Systemic lupus erythematosus-associated defects in the inhibitory receptor FcγRIIb reduce susceptibility to malaria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 7169–7174.
- Collins, A.V., Brodie, D.W., Gilbert, R.J.C., Iaboni, A., Manso-Sancho, R., Walse, B., Stuart, D.I., van der Merwe, P.A., and Davis, S.J. (2002). The Interaction Properties of Costimulatory Molecules Revisited. *Immunity* 17, 201–210.
- Cope, A.P. (2008). T cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* 10 Suppl 1, S1.
- Cope, A.P., Schulze-Koops, H., and Aringer, M. (2007). The central role of T cells in rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Rheumatol.* 25, S4.
- Deutsche Gesellschaft für Rheumatologie (2012). S1 Leitlinien zur medikamentösen Therapie der rheumatoiden Arthritis.
- Dhodapkar, K.M., Kaufman, J.L., Ehlers, M., Banerjee, D.K., Bonvini, E., Koenig, S., Steinman, R.M., Ravetch, J.V., and Dhodapkar, M.V. (2005). Selective blockade of inhibitory Fcγ receptor enables human dendritic cell maturation with IL-12p70 production and immunity to antibody-coated tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 2910–2915.
- Dörner, T., and Burmester, G.R. (2003). The role of B cells in rheumatoid arthritis: mechanisms and therapeutic targets. *Curr. Opin. Rheumatol.* 15, 246–252.
- Dörner, T., Jacobi, A.M., and Lipsky, P.E. (2009). B cells in autoimmunity. *Arthritis Res. Ther.* 11, 247.
- Egerer, K., Feist, E., and Burmester, G.-R. (2009). The serological diagnosis of rheumatoid arthritis: antibodies to citrullinated antigens. *Dtsch. Ärztebl. Int.* 106, 159–163.
- Emery, P., Gottenberg, J.E., Rubbert-Roth, A., Sarzi-Puttini, P., Choquette, D., Taboada, V.M.M., Barile-Fabris, L., Moots, R.J., Ostor, A., Andrianakos, A., et al. (2014). Rituximab versus an alternative TNF inhibitor in patients with rheumatoid arthritis who failed to respond to a single pre-

- vious TNF inhibitor: SWITCH-RA, a global, observational, comparative effectiveness study. *Ann. Rheum. Dis.* *annrheumdis* – 2013–203993.
- Engelmann, R., and Müller-Hilke, B. (2009). Antikörper gegen citrullinierte Peptidantigene in Klinik und Forschung. *Z. Für Rheumatol.* *68*, 485–490.
- Engelmann, R., Wang, N., Kneitz, C., and Müller-Hilke, B. (2014). Bone resorption correlates with the frequency of CD5+ B cells in the blood of patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology* *keu351*.
- Fauci, A.S., Braunwald, E., and Loscalzo, J. (2008). *Harrison's Principles of Internal Medicine* (17th Edition) (New York, NY, USA: McGraw-Hill Professional Publishing).
- Feldmann, M., Brennan, F.M., and Maini, R.N. (1996). Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annu. Rev. Immunol.* *14*, 397–440.
- Fiocco, U., Sfriso, P., Oliviero, F., Pagnin, E., Scagliori, E., Campana, C., Dainese, S., Cozzi, L., and Punzi, L. (2008). Co-stimulatory modulation in rheumatoid arthritis: The role of (CTLA4-Ig) abatacept. *Autoimmun. Rev.* *8*, 76–82.
- Flores-Borja, F., Jury, E.C., Mauri, C., and Ehrenstein, M.R. (2008). Defects in CTLA-4 are associated with abnormal regulatory T cell function in rheumatoid arthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 19396–19401.
- Floto, R.A., Clatworthy, M.R., Heilbronn, K.R., Rosner, D.R., MacAry, P.A., Rankin, A., Lehner, P.J., Ouwehand, W.H., Allen, J.M., Watkins, N.A., et al. (2005). Loss of function of a lupus-associated FcγRIIb polymorphism through exclusion from lipid rafts. *Nat. Med.* *11*, 1056–1058.
- Foulquier, C., Sebbag, M., Clavel, C., Chapuy-Regaud, S., Al Badine, R., Méchin, M.-C., Vincent, C., Nachat, R., Yamada, M., Takahara, H., et al. (2007). Peptidyl arginine deiminase type 2 (PAD-2) and PAD-4 but not PAD-1, PAD-3, and PAD-6 are expressed in rheumatoid arthritis synovium in close association with tissue inflammation. *Arthritis Rheum.* *56*, 3541–3553.
- Fransen, J., Creemers, M.C.W., and Riel, P.L.C.M.V. (2004). Remission in rheumatoid arthritis: agreement of the disease activity score (DAS28) with the ARA preliminary remission criteria. *Rheumatology* *43*, 1252–1255.
- Greene, J.L., Leytze, G.M., Emswiler, J., Peach, R., Bajorath, J., Cosand, W., and Linsley, P.S. (1996). Covalent Dimerization of CD28/CTLA-4 and Oligomerization of CD80/CD86 Regulate T Cell Costimulatory Interactions. *J. Biol. Chem.* *271*, 26762–26771.
- György, B., Tóth, E., Tarcsa, E., Falus, A., and Buzás, E.I. (2006). Citrullination: A posttranslational modification in health and disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *38*, 1662–1677.
- Healey, L.A. (1986). Rheumatoid arthritis in the elderly. *Clin. Rheum. Dis.* *12*, 173–179.
- Huscher, D., Sengler, C., Gromnica-Ihle, E., Bischoff, S., Eidner, T., Ochs, W., Richter, J., and Zink, A. (2013). Clinical presentation, burden of disease and treatment in young-onset and late-onset

- rheumatoid arthritis: a matched-pairs analysis taking age and disease duration into account. *Clin. Exp. Rheumatol.* **31**, 256–262.
- Innala, L., Kokkonen, H., Eriksson, C., Jidell, E., Berglin, E., and Rantapää-Dahlqvist, S. (2008). Antibodies Against Mutated Citrullinated Vimentin Are a Better Predictor of Disease Activity at 24 Months in Early Rheumatoid Arthritis Than Antibodies Against Cyclic Citrullinated Peptides. *J. Rheumatol.* **35**, 1002–1008.
- Jain, N., Nguyen, H., Chambers, C., and Kang, J. (2010). Dual function of CTLA-4 in regulatory T cells and conventional T cells to prevent multiorgan autoimmunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 1524–1528.
- Jawaheer, D., Seldin, M.F., Amos, C.I., Chen, W.V., Shigeta, R., Monteiro, J., Kern, M., Criswell, L.A., Albani, S., Nelson, J.L., et al. (2001). A Genomewide Screen in Multiplex Rheumatoid Arthritis Families Suggests Genetic Overlap with Other Autoimmune Diseases. *Am. J. Hum. Genet.* **68**, 927–936.
- Kavanaugh, A., Fleischmann, R.M., Emery, P., Kupper, H., Redden, L., Guertel, B., Santra, S., and Smolen, J.S. (2012). Clinical, functional and radiographic consequences of achieving stable low disease activity and remission with adalimumab plus methotrexate or methotrexate alone in early rheumatoid arthritis: 26-week results from the randomised, controlled OPTIMA study. *Ann. Rheum. Dis.* **annrheumdis** – 2011–201247.
- Kawano, S., Lin, Q., Amano, H., Kaneko, T., Nishikawa, K., Tsurui, H., Tada, N., Nishimura, H., Takai, T., Shirai, T., et al. (2013). Phenotype conversion from rheumatoid arthritis to systemic lupus erythematosus by introduction of Yaa mutation into FcγRIIB-deficient C57BL/6 mice: Immunomodulation. *Eur. J. Immunol.* **43**, 770–778.
- Klareskog, L., Gregersen, P.K., and Huizinga, T.W.J. (2010). Prevention of autoimmune rheumatic disease: state of the art and future perspectives. *Ann. Rheum. Dis.* **69**, 2062–2066.
- Kojima, T., Yabe, Y., Kaneko, A., Hirano, Y., Ishikawa, H., Hayashi, M., Miyake, H., Takagi, H., Kato, T., Terabe, K., et al. (2013). Monitoring C-reactive protein levels to predict favourable clinical outcomes from tocilizumab treatment in patients with rheumatoid arthritis. *Mod. Rheumatol. Jpn. Rheum. Assoc.* **23**, 977–985.
- Kono, H., Kyogoku, C., Suzuki, T., Tsuchiya, N., Honda, H., Yamamoto, K., Tokunaga, K., and Honda, Z.-I. (2005). FcγRIIB Ile232Thr transmembrane polymorphism associated with human systemic lupus erythematosus decreases affinity to lipid rafts and attenuates inhibitory effects on B cell receptor signaling. *Hum. Mol. Genet.* **14**, 2881–2892.
- Koorella, C., Nair, J.R., Murray, M.E., Carlson, L.M., Watkins, S.K., and Lee, K.P. (2014). Novel Regulation of CD80/CD86-induced Phosphatidylinositol 3-kinase Signaling by Notch1 in IL-6 and Indoleamine 2,3 dioxygenase Production by Dendritic Cells. *J. Biol. Chem.* **jbc.M113.519686**.
- Krummel, M.F., and Allison, J.P. (1996). CTLA-4 engagement inhibits IL-2 accumulation and cell cycle progression upon activation of resting T cells. *J. Exp. Med.* **183**, 2533–2540.

- Kurkó, J., Besenyei, T., Laki, J., Glant, T.T., Mikecz, K., and Szekanecz, Z. (2013). Genetics of Rheumatoid Arthritis — A Comprehensive Review. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* **45**, 170–179.
- Li, X., Wu, J., Carter, R.H., Edberg, J.C., Su, K., Cooper, G.S., and Kimberly, R.P. (2003). A novel polymorphism in the Fcγ receptor IIB (CD32B) transmembrane region alters receptor signaling. *Arthritis Rheum.* **48**, 3242–3252.
- Linsley, P.S., Bradshaw, J., Greene, J., Peach, R., Bennett, K.L., and Mittler, R.S. (1996). Intracellular Trafficking of CTLA-4 and Focal Localization Towards Sites of TCR Engagement. *Immunity* **4**, 535–543.
- Magnusson, V., Zunec, R., Odeberg, J., Sturfelt, G., Truedsson, L., Gunnarsson, I., and Alarcón-Riquelme, M.E. (2004). Polymorphisms of the Fcγ receptor type IIB gene are not associated with systemic lupus erythematosus in the Swedish population. *Arthritis Rheum.* **50**, 1348–1350.
- Mann, M.K., Maresz, K., Shriver, L.P., Tan, Y., and Dittel, B.N. (2007). B Cell Regulation of CD4+CD25+ T Regulatory Cells and IL-10 Via B7 is Essential for Recovery From Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J. Immunol.* **178**, 3447–3456.
- Manzotti, C.N., Tipping, H., Perry, L.C.A., Mead, K.I., Blair, P.J., Zheng, Y., and Sansom, D.M. (2002). Inhibition of human T cell proliferation by CTLA-4 utilizes CD80 and requires CD25+ regulatory T cells. *Eur. J. Immunol.* **32**, 2888–2896.
- Mathsson, L., Mullazehi, M., Wick, M.C., Sjöberg, O., van Vollenhoven, R., Klareskog, L., and Rönne- lid, J. (2008). Antibodies against citrullinated vimentin in rheumatoid arthritis: Higher sensitivity and extended prognostic value concerning future radiographic progression as compared with antibodies against cyclic citrullinated peptides. *Arthritis Rheum.* **58**, 36–45.
- Mauri, C., and Jury, E.C. (2010). Could the expression of CD86 and FcγRIIB on B cells be functionally related and involved in driving rheumatoid arthritis? *Arthritis Res. Ther.* **12**, 133.
- McGaha, T.L., Karlsson, M.C.I., and Ravetch, J.V. (2008). FcγRIIB Deficiency Leads to Autoimmunity and a Defective Response to Apoptosis in Mrl-MpJ Mice. *J. Immunol.* **180**, 5670–5679.
- Munn, D.H., Sharma, M.D., and Mellor, A.L. (2004). Ligation of B7-1/B7-2 by human CD4+ T cells triggers indoleamine 2,3-dioxygenase activity in dendritic cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **172**, 4100–4110.
- Niewold, T.B., Harrison, M.J., and Paget, S.A. (2007). Anti-CCP antibody testing as a diagnostic and prognostic tool in rheumatoid arthritis. *QJM Int. J. Med.* **100**, 193–201.
- Nimmerjahn, F., and Ravetch, J.V. (2006). Fcγ receptors: old friends and new family members. *Immunity* **24**, 19–28.
- Nimmerjahn, F., and Ravetch, J.V. (2008). Fcγ receptors as regulators of immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 34–47.
- Nimmerjahn, F., and Ravetch, J.V. (2010). Antibody-mediated modulation of immune responses. *Im- munol. Rev.* **236**, 265–275.

- Nishimoto, N., Terao, K., Mima, T., Nakahara, H., Takagi, N., and Kakehi, T. (2008). Mechanisms and pathologic significances in increase in serum interleukin-6 (IL-6) and soluble IL-6 receptor after administration of an anti-IL-6 receptor antibody, tocilizumab, in patients with rheumatoid arthritis and Castleman disease. *Blood* 112, 3959–3964.
- Nitschke, L., and Tsubata, T. (2004). Molecular interactions regulate BCR signal inhibition by CD22 and CD72. *Trends Immunol.* 25, 543–550.
- Odobasic, D., Leech, M.T., Xue, J.R., and Holdsworth, S.R. (2008). Distinct in vivo roles of CD80 and CD86 in the effector T-cell responses inducing antigen-induced arthritis. *Immunology* 124, 503–513.
- O'Neill, S.K., Shlomchik, M.J., Glant, T.T., Cao, Y., Doodles, P.D., and Finnegan, A. (2005). Antigen-Specific B Cells Are Required as APCs and Autoantibody-Producing Cells for Induction of Severe Autoimmune Arthritis. *J. Immunol.* 174, 3781–3788.
- O'Neill, S.K., Cao, Y., Hamel, K.M., Doodles, P.D., Hutas, G., and Finnegan, A. (2007). Expression of CD80/86 on B cells is essential for autoreactive T cell activation and the development of arthritis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 179, 5109–5116.
- Padyukov, L., Seielstad, M., Ong, R.T.H., Ding, B., Rönnelid, J., Seddighzadeh, M., Alfredsson, L., and Klareskog, L. (2010). A genome-wide association study suggests contrasting associations in ACPA-positive versus ACPA-negative rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* annrheum-dis126821.
- Pearse, R.N., Kawabe, T., Bolland, S., Guinamard, R., Kurosaki, T., and Ravetch, J.V. (1999). SHIP Recruitment Attenuates FcγRIIB-Induced B Cell Apoptosis. *Immunity* 10, 753–760.
- Van de Putte, L.B.A. (2004). Efficacy and safety of adalimumab as monotherapy in patients with rheumatoid arthritis for whom previous disease modifying antirheumatic drug treatment has failed. *Ann. Rheum. Dis.* 63, 508–516.
- Qureshi, O.S., Zheng, Y., Nakamura, K., Attridge, K., Manzotti, C., Schmidt, E.M., Baker, J., Jeffery, L.E., Kaur, S., Briggs, Z., et al. (2011). Trans-Endocytosis of CD80 and CD86: A Molecular Basis for the Cell-Extrinsic Function of CTLA-4. *Science* 332, 600–603.
- Radstake, T.R.D.J., Franke, B., Wenink, M.H., Nabbe, K.C.A.M., Coenen, M.J.H., Welsing, P., Bonvini, E., Koenig, S., Berg, W.B. van den, Barrera, P., et al. (2006). The functional variant of the inhibitory Fcγ receptor IIb (CD32B) is associated with the rate of radiologic joint damage and dendritic cell function in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 54, 3828–3837.
- Rosen, H.N., Moses, A.C., Garber, J., Iloputaife, I.D., Ross, D.S., Lee, S.L., and Greenspan, S.L. (2000). Serum CTX: a new marker of bone resorption that shows treatment effect more often than other markers because of low coefficient of variability and large changes with bisphosphonate therapy. *Calcif. Tissue Int.* 66, 100–103.
- Sakaguchi, S., Yamaguchi, T., Nomura, T., and Ono, M. (2008). Regulatory T Cells and Immune Tolerance. *Cell* 133, 775–787.

- Sakaguchi, S., Benham, H., Cope, A.P., and Thomas, R. (2012). T-cell receptor signaling and the pathogenesis of autoimmune arthritis: insights from mouse and man. *Immunol. Cell Biol.* 90, 277–287.
- Sansom, D.M., Manzotti, C.N., and Zheng, Y. (2003). What's the difference between CD80 and CD86? *Trends Immunol.* 24, 313–318.
- Sato-Hayashizaki, A., Ohtsui, M., Lin, Q., Hou, R., Ohtsui, N., Nishikawa, K., Tsurui, H., Sudo, K., Ono, M., Izui, S., et al. (2011). Presumptive role of 129 strain-derived Sle16 locus in rheumatoid arthritis in a new mouse model with Fcγ receptor type IIb-deficient C57BL/6 genetic background. *Arthritis Rheum.* 63, 2930–2938.
- Scher, J.U., Bretz, W.A., and Abramson, S.B. (2014). Periodontal disease and subgingival microbiota as contributors for rheumatoid arthritis pathogenesis: modifiable risk factors? *Curr. Opin. Rheumatol.* 1.
- Schütt, C. (2011). *Grundwissen Immunologie* (Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag).
- Scott, D.L., and Kingsley, G.H. (2006). Tumor Necrosis Factor Inhibitors for Rheumatoid Arthritis. *N. Engl. J. Med.* 355, 704–712.
- Sestak, A.L., Shaver, T.S., Moser, K.L., Neas, B.R., and Harley, J.B. (1999). Familial aggregation of lupus and autoimmunity in an unusual multiplex pedigree. *J. Rheumatol.* 26, 1495–1499.
- Shimamoto, K., Ito, T., Ozaki, Y., Amuro, H., Tanaka, A., Nishizawa, T., Son, Y., Inaba, M., and Nomura, S. (2013). Serum interleukin 6 before and after therapy with tocilizumab is a principal biomarker in patients with rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* 40, 1074–1081.
- Smolen, J.S., and Steiner, G. (2003). Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2, 473–488.
- Srirangan, S., and Choy, E.H. (2010). The Role of Interleukin 6 in the Pathophysiology of Rheumatoid Arthritis. *Ther. Adv. Musculoskelet. Dis.* 2, 247–256.
- Steinman, R.M., Hawiger, D., Liu, K., Bonifaz, L., Bonnyay, D., Mahnke, K., Iyoda, T., Ravetch, J., Dhodapkar, M., Inaba, K., et al. (2003). Dendritic Cell Function in Vivo during the Steady State: A Role in Peripheral Tolerance. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 987, 15–25.
- Su, K., Li, X., Edberg, J.C., Wu, J., Ferguson, P., and Kimberly, R.P. (2004a). A Promoter Haplotype of the Immunoreceptor Tyrosine-Based Inhibitory Motif-Bearing FcγRIIb Alters Receptor Expression and Associates with Autoimmunity. II. Differential Binding of GATA4 and Yin-Yang1 Transcription Factors and Correlated Receptor Expression and Function. *J. Immunol.* 172, 7192–7199.
- Su, K., Wu, J., Edberg, J.C., Li, X., Ferguson, P., Cooper, G.S., Langefeld, C.D., and Kimberly, R.P. (2004b). A Promoter Haplotype of the Immunoreceptor Tyrosine-Based Inhibitory Motif-Bearing FcγRIIb Alters Receptor Expression and Associates with Autoimmunity. I. Regulatory FCGR2B

- Polymorphisms and Their Association with Systemic Lupus Erythematosus. *J. Immunol.* 172, 7186–7191.
- Tang, Q., Boden, E.K., Henriksen, K.J., Bour-Jordan, H., Bi, M., and Bluestone, J.A. (2004). Distinct roles of CTLA-4 and TGF- β in CD4+CD25+ regulatory T cell function. *Eur. J. Immunol.* 34, 2996–3005.
- Tutuncu, Z., Reed, G., Kremer, J., and Kavanaugh, A. (2006). Do patients with older-onset rheumatoid arthritis receive less aggressive treatment? *Ann. Rheum. Dis.* 65, 1226–1229.
- U.S. National Library of Medicine (2014a). Reference SNP (refSNP) Cluster Report: rs3219018 **Clinical Channel**.
- U.S. National Library of Medicine (2014b). Reference SNP (refSNP) Cluster Report: rs1050501 ** With Pathogenic allele **.
- Vandenborre, K., Van Gool, S.W., Kasran, A., Ceuppens, J.L., Boogaerts, M.A., and Vandenberghe, P. (1999). Interaction of CTLA-4 (CD152) with CD80 or CD86 inhibits human T-cell activation. *Immunology* 98, 413–421.
- Vossenaar, E.R., Després, N., Lapointe, E., van der Heijden, A., Lora, M., Senshu, T., van Venrooij, W.J., and Ménard, H.A. (2004). Rheumatoid arthritis specific anti-Sa antibodies target citrullinated vimentin. *Arthritis Res. Ther.* 6, R142–R150.
- Waisberg, M., Tarasenko, T., Vickers, B.K., Scott, B.L., Willcocks, L.C., Molina-Cruz, A., Pierce, M.A., Huang, C., Torres-Velez, F.J., Smith, K.G.C., et al. (2011). Genetic susceptibility to systemic lupus erythematosus protects against cerebral malaria in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 1122–1127.
- Wells, G., Becker, J.-C., Teng, J., Dougados, M., Schiff, M., Smolen, J., Aletaha, D., and Riel, P.L.C.M. van (2009). Validation of the 28-joint Disease Activity Score (DAS28) and European League Against Rheumatism response criteria based on C-reactive protein against disease progression in patients with rheumatoid arthritis, and comparison with the DAS28 based on erythrocyte sedimentation rate. *Ann. Rheum. Dis.* 68, 954–960.
- Welsing, P.M.J., and Riel, P.L.C.M. van (2004). The Nijmegen inception cohort of early rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* 69, 14–21.
- Willcocks, L.C., Carr, E.J., Niederer, H.A., Rayner, T.F., Williams, T.N., Yang, W., Scott, J.A.G., Urban, B.C., Peshu, N., Vyse, T.J., et al. (2010). A defunctioning polymorphism in FCGR2B is associated with protection against malaria but susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 7881–7885.
- Wilson, C., Tiwana, H., and Ebringer, A. (2000). Molecular mimicry between HLA-DR alleles associated with rheumatoid arthritis and *Proteus mirabilis* as the aetiological basis for autoimmunity. *Microbes Infect.* 2, 1489–1496.

- Wollenhaupt, J., Alten, R., Backhaus, M., Baerwald, C., Braun, J., Burkhardt, H., Gaubitz, M., Gromnica-Ihle, E., Kellner, H., Kuipers, J., et al. (2009). Aktualisiertes Therapieschema der Rheumatoiden Arthritis. Ergebnisse eines Konsensusprozesses deutscher Rheumatologen 2009. *Aktuelle Rheumatol.* 34, 234–239.
- Yilmaz-Elis, A.S., Ramirez, J.M., Asmawidjaja, P., Kaa, J. van der, Mus, A.-M., Brem, M.D., Claasens, J.W.C., Breukel, C., Brouwers, C., Mangsbo, S.M., et al. (2014). FcγRIIb on Myeloid Cells Rather than on B Cells Protects from Collagen-Induced Arthritis. *J. Immunol.* 192, 5540–5547.
- Zheng, Y., Manzotti, C.N., Liu, M., Burke, F., Mead, K.I., and Sansom, D.M. (2004). CD86 and CD80 Differentially Modulate the Suppressive Function of Human Regulatory T Cells. *J. Immunol.* 172, 2778–2784.
- Zink, A., Mau, W., and Schneider, M. (2001). Epidemiologische und sozialmedizinische Aspekte entzündlich-rheumatischer Systemerkrankungen. *Internist* 42, 211–222.

VII. Danksagung

An erster Stelle danke ich Frau Prof. Dr. Brigitte Müller-Hilke für die Überlassung des Themas zu dieser Arbeit. Ich danke Ihr insbesondere für die Geduld und Unterstützung, die sie mir in jeder Phase dieser Arbeit entgegengebracht hat. Für die intensiven Diskussionen, ihre konstruktive Kritik sowie die hilfreichen Anmerkungen und Ideen, die zur Vollendung dieser Arbeit beitrugen.

Dank gebührt ebenso dem gesamten Team der Arbeitsgruppe um Frau Prof. Dr. Müller-Hilke für die konstruktiven Gespräche, Anregungen und die ein oder andere zündende Idee in den Labor Meetings oder im Journal Club.

Besonderen Dank schulde ich Herrn Dr. Robby Engelmann für die Hilfsbereitschaft, Großzügigkeit, Muße und Geduld, die er mir bei der Bearbeitung des Themas und der Niederschrift entgegenbrachte. Ich bedanke mich für all die sachdienlichen Hinweise, die Erläuterungen komplexer Zusammenhänge und seinen permanenten Beistand in den Phasen der Laborarbeit und der schriftlichen Verfassung.

Herrn Prof. Dr. Kneitz und Herrn Prof. Dr. Neeck vom Südstadtklinikum der Universität Rostock, sowie dem dortigen Team der rheumatologischen Ambulanz, danke ich für die tatkräftige Unterstützung bei der Datenerhebung.

Ebenso danke ich Heike Filla und Frau Dr. Jessica Y. Schneider für die Durchsicht meiner Arbeit und die vielen Hinweise und Anregungen, die zur Vollendung derselben notwendig waren.

Herzlich möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die mich immer bestärkt hat diesen Weg zu gehen. Die mir Vertrauen geschenkt hat und mir auch in Phasen des Zweifels immer wieder Mut gemacht hat. Ich danke Ihr für jedes offene Ohr und jedes aufbauende Wort in dieser nicht immer einfachen Zeit.

Für die Kniffs und Tricks der Formatierung, für jeden geduldigen Ratschlag, für all die aufmunternden und stützenden Worte aus dem reichen Erfahrungsschatz der Promotionsphase danke ich Dir, Thomas, von ganzem Herzen.

VIII. Thesen

1. Der Fc γ RIIb korreliert in seiner genetischen Vielfalt anders mit dem klinischen Bild der RA als mit dem Erscheinungsbild des SLE.
2. Träger eines seltenen TM- oder Promotorallels des *FCGR2b* Gens haben keine Nachteile im Krankheitsverlauf der RA.
3. Auch wenn die Zytokinproduktion von IL6 und IL10 unterschiedlich mit der Allelvariante im TM-Exon und Promotor korreliert, weist das Netto-Resultat der Entzündungsparameter keine signifikanten Unterschiede auf.
4. Klinische und laborchemische Parameter der *FCGR2b*-Polymorphismustragenden Kohorte weisen keine Korrelation mit dem Krankheitsverlauf der RA auf.
5. RA-Patienten mit einem seltenen Allel erhalten zur Therapie ihrer Erkrankung niedrigere Steroiddosen und anteilig am häufigsten die Basismedikation.
6. Die negative Korrelation zwischen Allelvariante und Höhe der ACPA-Titer bleibt aus.
7. Die genetische Veränderung im TM-Exon korreliert mit einem verminderten Aktivierungsgrad der B-Lymphozyten.
8. Die differentielle Expression kostimulatorischer Moleküle lässt vermuten, dass bei Vorliegen einer Allelvariante über unterschiedliche Wege eine effektive Suppression durch regulatorische T-Lymphozyten auf die nachgeschaltete Immunreaktion ausgeübt werden kann.
9. Die Allelvarianten könnten bei der multifaktoriellen Genese der RA einen Vorteil gegenüber Infektios-inflammatorischen Risikofaktoren darstellen.
10. Allelvarianten im *FCGR2b* Gen stellen nicht zwingend einen negativen Risikofaktor in der komplexen Pathogenese der RA dar.

IX. Eidesstattliche Erklärung

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

zum Antrag auf Zulassung zur Promotion gemäß Promotionsordnung

Hiermit erkläre ich, dass ich an keiner anderen Stelle einen Antrag auf Zulassung zur Promotion gestellt habe bzw. bereits einen Dokortitel auf der Grundlage dieses medizinischen Studiums erworben habe und mich auch nicht einer medizinischen Doktorprüfung erfolglos unterzogen habe.

Ich versichere, dass ich die an der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock zur Promotion eingereichte Arbeit mit dem Titel: *„Die Korrelation von Promotor- und Transmembran Polymorphismus im FCGR2b-Gen mit dem klinischen Bild der rheumatoiden Arthritis“* in dem Institut für Medizinische Immunologie unter Anleitung von Prof. Dr. rer. nat. Brigitte Müller-Hilke selbst verfasst habe und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Abhandlung aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Die Dissertation wurde ohne Hinzuziehung einer kommerziellen Promotionsberatung erstellt.

Rostock, August 2015

Stefanie Meister